

MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER HÖHENATMUNG DER ANDENGANS UND DES SPERBERGEIERS

Die Primärstrukturen der Hämoglobine
folgender ornithologischer Vertreter:

- Graugans (*Anser anser*) (α^D)
- Streifengans (*Anser indicus*) (α^D)
- Andengans (*Chloephaga melanoptera*)
- Sperbergeier (*Gyps rueppellii*)
- Wollkopfgeier (*Trigonoceps occipitalis*)
- Habicht (*Accipiter gentilis*)
- Mönchsgeier (*Aegypius monachus*)

Inge Elisabeth Hiebl

MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER HÖHENATMUNG
DER ANDENGANS UND DES SPERBERGEIERS

Die Primärstrukturen der Hämoglobine
folgender ornithologischer Vertreter:

Graugans (*Anser anser*) (α^D)

Streifengans (*Anser indicus*) (α^D)

Andengans (*Chloephaga melanoptera*)

Sperbergeier (*Gyps rueppellii*)

Wollkopfeier (*Trigonoceps occipitalis*)

Habicht (*Accipiter gentilis*)

Mönchsgeier (*Aegypius monachus*)

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Inge Elisabeth Hiebl
aus Starnberg
1987

1.Berichterstatter: Prof.Dr.G. Braunitzer

2.Berichterstatter: Prof.Dr.G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.1987

Scribendum ergo quam diligentissime et quam plurimum. nam ut terra alte refossa generandis alendisque seminibus fecundior, sic profectus non a summo petitus studiorum fructus et fundit uberius et fidelius continet.

Quintilian, Institutio oratoria X,III,2

MEINEM OTTMAR

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
A: EINLEITUNG	1
B: MATERIAL UND METHODEN	3
1. Gewinnung der Hämoglobinlösung	3
2. Hämabspaltung	3
3. Elektrophoresen	4
3.1. Vertikale Disk-Gelelektrophorese	
3.2. Vertikale Triton-Gelelektrophorese	
4. Trennung der Hämoglobine	4
4.1. Säulenchromatographie	
4.2. FPLC	
5. Isolierung der Globinketten	5
5.1. Ionenaustauschchromatographie	
5.2. HPLC	
6. Bestimmung der Primärstrukturen der Globinketten	6
6.1. Oxidation der Ketten	
6.2. Spaltung der Ketten	
6.2.1. Tryptische Spaltung	
6.2.2. Chemische Spaltung	
6.3. Trennung der Peptide	
6.3.1. TSK-Gelchromatographie	
6.3.2. HPLC	
6.4. Reinheitsprüfung der Peptide	
6.4.1. Dünnschichtelektrophorese	
6.4.2. Analysen	
6.5. Sequenzanalyse	
7. Hybridisierung von Hämoglobinen	10

C: ERGEBNISSE

11

8. *Anser anser* (Graugans) und *A. indicus* (Streifengans)

11

8.1. Komponententrennung

8.2. Kettentrennung

8.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^D -Ketten9. *Chloephaga melanoptera* (Andengans)

16

9.1. Komponententrennung

9.2. Kettentrennung

9.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , α^D - und β -Ketten10. *Accipiter gentilis* (Habicht)

20

10.1. Komponententrennung

10.2. Kettentrennung

10.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , α^D - und β -Ketten11. *Gyps rueppellii* (Sperbergeier)

24

11.1. Komponententrennung

11.2. Kettentrennung

11.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , $\alpha^{A'}$, α^D , $\alpha^{D'}$ - und β -Ketten12. *Trigonoceps occipitalis* (Wollkopfgeier)

31

12.1. Komponententrennung

12.2. Kettentrennung

12.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , α^D - und β -Ketten

13. Hybridisierung von Hämoglobinen

32

14. Ergebnisse der Sequenzanalyse

33

Tabellen der Analysen: 34-49

Sequenzen: 50-56

D: DISKUSSION

57

15. Molekulare Mechanismen der Höhenatmung

57

*15.1. Struktur und Funktion des Hämoglobins**15.2. Physiologie des Hämoglobins in großen Höhen***16. Molekularbiologie der Höhenatmung der Gänse**

60

*16.1. Hämoglobine der Streifengans**16.2. Hämoglobine der Andengans**16.3. Bedeutung der Bindungsstelle $\alpha_1 119-\beta_1 55$ für die Höhenatmung***17. Molekularbiologie der Höhenatmung der Greifvögel**

65

*17.1. Hämoglobine des Sperbergeiers**17.2. Physiologie der Hämoglobine des Sperbergeiers**17.3. Molekularbiologie der Höhenatmung der Greifvögel**17.4. Affinitätskontrollierte Kaskade multipler Hämoglobine**17.5. Erhöhter Phosphateffekt bei Hämoglobin A/A' des Sperbergeiers**17.6. Habicht als potentiell hypoxietolerant**17.7. Möncnsgeier und Wollkopfgeier als molekularbiologisch hypoxieintolerant***18. Molekulare Mechanismen der Höhenatmung im Überblick**

74

19. Struktur und Funktion von Hb D

75

*19.1. Das α^D -Gen - zwischen Aktivierung und Desaktivierung ?**19.2. Hb D - biologische Reserve der Natur ?***20. Genetischer Polymorphismus der Globingene der Vögel**

78

*20.1. Expression von vier α -Ketten des adulten Sperbergeiers**20.2. Polymorphismus der Minorkomponenten der Graugans, Streifengans und Andengans**20.3. Differentielle Expression des α^D -Globingens der Andengans***21. Phylogenetische Betrachtungen**

80

*21.1. Accipitridae (Greife) als genetisch definierte Familie**21.2. Stellung der Andengans in der Familie der Anatidae***22. Identische Hämoglobine**

84

E: Zusammenfassung

85

F: Literatur

88

ABKÜRZUNGEN

B = Acetonitril

CM- = Carboxymethyl-

DEAE- = Diethylaminoethyl-

DNA = Desoxyribonucleinsäure

2,3.-DPG = *D*-2,3,-Diphosphoglycerat

DTE = Dithioerythrit

FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography

Hb = Hämoglobin

HEPES = *N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethylsulfonat

hnRNA = heterogene nucleare Ribonucleinsäure

HPLC = Hochdruckflüssigchromatographie

IHP = *myo*-Inosit-*D*-1,2,3,4,5,6-hexaphosphat

IPP = *myo*-Inosit-*D*-1,3,4,5,6-pentaphosphat

kb = Kilobasen

NAD = Nicotinadenindinucleotid

NADP = Nicotinadenindinucleotidphosphat

Polybren = Polymer aus 1,3-Dibrompropan und 2,4-Diaminohexan

PTH = Phenylthiohydantoin

P₅₀ = Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins

Quadrol = *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-hydroxypropyl)-ethylendiamin

RP = reversed phase

SP- = Sulfopropyl-

TFA = Trifluoressigsäure

Tos-Phe-CH₂Cl = (*N*-Tosyl-*L*-phenylalanyl)chlormethan

Tp = tryptisches Peptid

Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer in der Zeit von Januar 1985 bis April 1987 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Braunitzer für die Überlassung der sehr interessanten und fruchtbaren Themenstellung, sowie für seine wertvollen Hinweise und Anregungen.

Herzlicher Dank ergeht an Herrn Prof. Dr. R.E. Weber, Biologisches Institut der Universität Odense, Dänemark, für die Durchführung der physiologischen Messungen, sowie für seine Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Kösters und Herrn Dr. D. Schneeganß, Institut für Geflügelkrankheiten der Universität München, Oberschleißheim, und bei der Falknerei Schmidt, Bad Wörishofen, für die Bereitstellung der Blutproben, sowie bei Frau Dr. T. Kleinschmidt für ihre Hilfe bei der Zusammenstellung der Tabelle identischer Hämoglobine.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie bin ich für die entgegengebrachte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. O. Hofmann danke ich herzlichst für die Durchsicht der Arbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

A: E I N L E I T U N G

Vögel sind die erfolgreichste Klasse der Vertebraten im Hinblick auf Überleben und Fortpflanzung in großen Höhen. Von mindestens zwölf Vogelarten ist bekannt, daß sie in 5000 m Höhe brüten⁽¹⁾; Streifengänse fliegen zweimal jährlich von Indien über das Himalaya-Gebirge (8848 m; $pO_2 = 50$ mm Hg; entspricht 30% dessen in Seehöhe) zum Brüten nach Tibet⁽²⁾ und können kurze Aufenthalte in Höhen von 10668 m ertragen⁽³⁾.

Andengänse sind hochalpine Vögel; sie leben in den Anden (6000m; $pO_2 = 71$ mm Hg; entspricht 45% dessen in Seehöhe), hauptsächlich Peru und Bolivien⁽⁴⁾.

Die extremsten hypoxischen Bedingungen, denen sich je ein Lebewesen ausgesetzt hat, liegen bei 11300 m ($pO_2 = 36$ mm Hg; entspricht 22% dessen in Seehöhe). In dieser Höhe geriet ein Sperbergeier 1973 in das Triebwerk eines Flugzeuges über Abijan an der Küste von Ivory in West Afrika⁽⁵⁾. Wenige Federn hatten eine sichere Identifizierung erlaubt.

Trotz der hohen physiologischen Leistungsfähigkeit des Respirationstraktes der Vögel⁽⁶⁾ muß für derartige Anpassungen eine genetische Basis postuliert werden. Da das Problem in großen Höhen in der ausreichenden Sauerstoffaufnahme und -versorgung des Organismus bei niedrigem Sauerstoffangebot der Umgebung liegt, kommt dem Hämoglobin eine Schlüsselrolle für die Molekularbiologie der Höhenatmung zu. Die Deutung liegt in den Primärstrukturen der Globinketten, welche für die Modulation der Sauerstoffaffinität sowie für allosterische Effekte determinierend sind.

Um die physiologisch wichtigen Aminosäuren der 287 Reste eines Hämoglobinmoleküls zu ermitteln, war es notwendig, neben den Primärstrukturen der Hämoglobine der Streifengans, der Andengans und des Sperbergeiers, die nahe verwandter Spezies aus dem Flachland (Graugans, Habicht und Wollkopfgeier) als biologische Referenz aufzuklären. Insgesamt wurden 16 Ketten komplett und zwei Ketten N-terminal sequenziert (= 2360 Sequenzen).

Ferner wurden die physiologischen Parameter der Hämoglobine des Sperbergeiers und des Wollkopfgeiers bestimmt; für die Hämoglobine der Andengans, der Graugans und der Streifengans lagen diese Daten bereits vor.

Zur effektiven und eindeutigen Untersuchung der Hämoglobine wurden die Methoden der Protein- und Peptidisolierung im Hinblick auf das Sequenzieren im Mikromaßstab optimiert. Besondere Bedeutung kam der Isolierung der Hämoglobine zu. So wurde erstmals eine Komponententrennung mittels FPLC ausgearbeitet. Dies ermöglichte die Gewinnung von Hämoglobinen mit nur geringen Unterschieden der Oberflächenladung (ein Austausch pro Kette) in hoher Ausbeute und Reinheit und die Erfassung von Minorkomponenten, welche zu 5% vorlagen. Bisher nicht entdeckte Hämoglobine im Blut der Vögel konnten nachgewiesen werden unter gleichzeitiger Reduktion der

Menge an benötigtem Blut.

Übereinstimmende Ergebnisse der Physiologie, der Molekularbiologie (Sequenzanalyse) und der Röntgenstrukturanalyse erlaubten die molekulare Deutung der Höhenatmung der Streifengans, der Andengans und des Sperbergeiers:

Die ungewöhnliche Hypoxietoleranz des Sperbergeiers gründet sich auf eine dreifache affinitätskontrollierte Kaskade für Sauerstoffaufnahme und -transport: vier durch Genduplikation entstandene Hämoglobine werden durch partielle Inaktivierung an zwei Bindungsstellen der Untereinheiten funktionell moduliert, so daß drei Affinitätsniveaus entstehen.

Bei den Hämoglobinen der Gänse ist eine Wechselwirkung der Untereinheiten von großem strukturellem und atmungsphysiologischem Einfluß lokalisiert worden. Inaktivierung dieser Wechselwirkung durch einen Austausch in den α^A -Ketten der Streifengans erzeugt die Expression von zwei verschieden affinen Hämoglobinen, welche sich zu einer diffusionskontrollierten biphasischen Kaskade formieren. Bei den Hämoglobinen der Andengans ist dieselbe Bindungsstelle durch einen Austausch in den β -Ketten inaktiviert, so daß zwei hochaffine Hämoglobine die Folge sind.

Meine Ergebnisse zeigen, daß für transitorische Anpassungen an große Höhen eine Gradation der Affinitäten der Hämoglobine zur ausreichenden Sauerstoffversorgung des Organismus nötig ist, während für permanenten Aufenthalt unter hypoxischen Bedingungen hohe intrinsische Affinität adaptiv günstig ist. Diese Befunde liefern einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des viel diskutierten Problems der Höhenatmung auf molekularer Ebene. Die an ausgewählten ornithologischen Vertretern gewonnenen Gesetzmäßigkeiten sind richtungsweisend für die Atmungsphysiologie unter reduzierten Sauerstoffpartialdrücken.

Daneben wird die nicht eindeutig geklärte funktionelle und evolutionäre Bedeutung der Minorkomponente Hb D im Blut der Vögel dargelegt: es wird gezeigt, daß das α^D -Gen als biologische Reserve eine Zwischenstellung zwischen Aktivierung und Desaktivierung einnimmt.

Erwähnenswert ist, daß Gänse neben ihrer Bedeutung für die vergleichende Verhaltensforschung nun zum klassischen Studienobjekt der Molekularbiologie der Höhenatmung geworden sind.

B: MATERIAL UND METHODEN

1. Gewinnung der Hämoglobininlösung

Etwa 2 - 5 ml Blut wurden der Beinvene der adulten Vögel entnommen und zur Verhinderung der Koagulation mit Heparin versetzt: die Blutproben der Grau- (*Anser anser*) und Streifengans (*Anser indicus*) stammten aus dem Tierpark Hellabrunn, München, die des Habichts (*Accipiter gentilis*) und der Andengans (*Chloephaga melanoptera*) aus dem Institut für Geflügelkrankheiten, Oberschleißheim, und die des Sperbergeiers (*Gyps rueppellii*) und des Wollkopfsgeiers (*Trionoceph occipitalis*) aus der Falknerei Schmidt, Bad Wörishofen.

Nach Abtrennen des Plasmas durch Zentrifugation (3000 Umdrehungen/Minute) wurden die Erythrocyten dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung (0.9 M NaCl) gewaschen und bei -68°C aufbewahrt.

Zur Hämolyse wurde mit dem doppelten Volumen destillierten Wassers versetzt. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert und der Rückstand zur quantitativen Extraktion des Hämoglobins mehrmals mit Wasser gewaschen.

Das Blut des Habichts war hämolysiert, so daß das Hämoglobin durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat von den Serumproteinen getrennt wurde⁽⁷⁾. Nach Entfernen der Zellfragmente wurde die Lösung mit kristallinem Ammoniumsulfat bis zu 50% (g/v) gesättigt. Das Hämoglobin wurde durch Zentrifugation abgetrennt, in Wasser aufgelöst und drei Stunden gegen Wasser dialysiert.

Die Konzentration wurde nach Ligandierung mit Cyanidionen bestimmt⁽⁸⁾: je 0.02 ml Hb-Lösung wurden mit 4 ml Transformationslösung (0.16% $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ und 0.16% KCN in Wasser) versetzt. Nach 15 Minuten wurden die Extinktionen des stabilen Komplexes bei 540 nm gemessen.

2. Häm-Abspaltung⁽⁹⁾

990 ml Aceton p.A. und 10 ml 36%-ige HCl wurden im Erlenmeyerkolben auf -18°C gekühlt; unter Rühren wurden 10 ml Hb-Lösung (= 100-400 mg Hb) langsam zutropft. Nach 30 min bei 0°C hatte sich das Globin als weißer Niederschlag abgesetzt. Der braune, das Häm enthaltende, Überstand wurde dekantiert, das Globin wiederholt mit kaltem Aceton gewaschen; nach Aufnahme in Wasser wurde gegen 0.1 N Essigsäure dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeuten lagen zwischen 60 und 70%.

3. Elektrophoresen

3.1. Vertikale Disk-Gelelektrophorese ⁽¹⁰⁾

Unter nicht-dissoziierenden Bedingungen wurde im alkalischen pH-Bereich die Anzahl der Hämoglobin-Komponenten der Blutproben ermittelt.

Es wurde ein 10%-iges Polyacrylamidgel hergestellt: 4.5% Tris/1 N HCl, 0.06% N,N'-Tetramethyldiamin, 10% Acrylsäureamid, 0.16% N,N'-Methylenbisacrylsäureamid und 0.035% Ammoniumperoxodisulfat. An die Rundgele (Durchmesser 0.5 cm, Länge 7.5 cm) wurden 4.5 mA pro Gel für eine Stunde angelegt. Es wurden 0.02 mg Hb aufgetragen.

Als Puffer diente 0.07 M Tris/Glycin (pH 8.3). Die Proteinbanden wurden mit 10%-iger Amidoschwarz-10B-Lösung angefärbt, überschüssiger Farbstoff mit 10%-iger Essigsäure durch Diffusion entfernt.

3.2. Vertikale Triton-Gelelektrophorese ⁽¹¹⁾

Die Anzahl der Globinketten wurde im sauren pH-Bereich unter denaturierenden Bedingungen bestimmt. Das Polyacrylamidgel, welches Harnstoff und das nicht-ionische Tensid Triton X-100 enthielt, besaß folgende Zusammensetzung: 12% Methylenbisacrylamid, 5% Eisessig, 5% Tetramethylethyldiamin, 48% Harnstoff, 2% Triton X-100 und 0.04% Ammoniumperoxodisulfat. An die Rundgele (s. 3.1.) wurden für drei Stunden 140 Volt angelegt.

Es wurden jeweils 0.02 mg Globin bzw. Ketten in 0.05 ml Probenpuffer (40.4% Harnstoff, 8.3% Eisessig, 8.3% β -Mercaptoethanol) aufgetragen. Detektion erfolgte wie unter 3.1. beschrieben.

4. Trennung der Hämoglobine

4.1. Säulenchromatographie ⁽¹²⁾

Die Hämoglobinkomponenten wurden über eine CM-Sephadex C-50 Säule (1.6 x 10 cm) bei 4°C getrennt in einem Puffer aus 0.05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ und 0.0015 M KCN. Das Hämolyt wurde zur Erzeugung von Cyanmethämoglobin mit dem zehnfachen Volumen einer Lösung aus 2.5g KCN, 10g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ und 50g NaHCO_3 pro Liter Wasser versetzt. Die Probe wurde 16h gegen Startpuffer dialysiert und unter Stickstoff in einer Amicon Ultrafiltrationszelle (Diaflo-Membran PM 10, Amicon Corp., Lexington, Mass.) bis 100 mg/ml eingengt. Eluiert wurde in einem linearen Gradienten von 0.05 M - 0.25 M Phosphat (Flußrate 50 ml/h). Die Extinktion wurde bei 415 nm gemessen.

4.2.FPLC

Die Komponententrennung erfolgte über eine GlasPac TSK SP-5PW-Säule (8 x 75 mm; LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden), einen starken Kationenaustauscher (Sulphopropylgruppen). Gearbeitet wurde am LKB Ultrachrom GTi Bioseparation System für FPLC, dessen Leitungen aus Titanlegierungen und inerten Polymeren bestehen.

Das Hämoglobin wurde zentrifugiert und wiederholt gegen bidestilliertes Wasser bei 4°C dialysiert. Die Hb-Konzentration betrug 0.8 mM/l. 0.1 ml dieser Lösung versetzt mit 0.05 ml Puffer A, wurden auf die Säule aufgetragen.

Puffer A wurde hergestellt durch Mischen einer 0.01 M Lösung von Na_2HPO_4 mit einer 0.01 M Lösung von NaH_2PO_4 bis zu einem pH-Wert von 6.75. Die Endkonzentrationen des Puffers betrugen 0.005 M NaH_2PO_4 und 0.004 M Na_2HPO_4 . Puffer B enthielt 1 M NaCl. Das Abfallen des pH-Wertes infolge des Salzeffektes mußte durch Zugabe von 0.01 M NaH_2PO_4 -Lösung korrigiert werden, so daß die Endkonzentrationen bei 0.002 M NaH_2PO_4 und 0.007 M Na_2HPO_4 lagen.

Die Komponenten wurden in einem linearen Gradienten von 0 - 10% B in 5 min und 10 - 25% B in 30 min eluiert. Die Flußrate betrug 0.5 ml/min; die Extinktion wurde bei 280 nm gemessen.

5. Isolierung der Globinketten

5.1. Ionenaustauschchromatographie ⁽¹³⁾

Die Trennung erfolgte über eine Säule aus CM 52 Cellulose (2.5 x 17 cm bzw. 1.6 x 10 cm; Whatman) mit 8 M Harnstoff, 0.02 M Natriumacetat und 0.01% DTE als Puffer (pH 5.3). Natives Globin (40 - 200 mg), gelöst in 5 ml Puffer unter Zusatz von 30% DTE, wurde auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde in einem linearen Gradienten von 0.02 - 0.1 M NaCl (500 + 500 ml) und 0.12 - 0.25 M NaCl (450 + 450 ml) (für Greifvögel) oder 0.02 - 0.1 M NaCl, pH 5.0 - 5.8 (600 + 600 ml) und 0.1 - 0.3 M NaCl, pH 5.8 (300 + 300 ml) (für Gänse) bei einer Flußrate von 30 ml/h.

Die Ketten wurden über eine Säule aus Sephadex G25 medium (2.5 x 190 cm) mit 0.1 N Essigsäure entsalzt; die Flußrate betrug 150 ml/h.

5.2.HPLC

Das mit 0.1%-iger TFA versetzte Lysat (max. 2 mg Hb) wurde über eine Nucleosil C_4 -Säule (0.007 mm Porengröße, 4.6 x 250 mm, Macherey & Nagel) in Häm und die einzelnen Ketten getrennt. Als

polare Phase diente 0.1%-ige TFA. Eluiert wurde in einem linearen Gradienten von 0 - 40% Acetonitril in 2 min und 40 - 60 % in 60 min. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Es wurde bei 230 nm detektiert.

Die Arbeiten erfolgten am Beckman Gradient Liquid Chromatograph Model 334, Controller 421. Als Pumpen wurden Beckmann 110A und 100A, als UV-Photometer Biotronik BT 3030 und als Schreiber Shimadzu C-RIA verwendet.

6. Bestimmung der Primärstrukturen der Globinketten

6.1. Oxidation der Ketten ⁽¹⁴⁾

Jeweils 2 - 7 mg der Globinketten wurden mit 0.1 - 0.25 ml 10%-iger Perameisensäure 2 min bei 0°C oxidiert. Überschüssige Säure wurde am Rotationsverdampfer entfernt; die Globinketten wurden lyophilisiert.

6.2. Spaltung der Ketten

6.2.1. Tryptische Spaltung ⁽¹⁵⁾

Die oxidierten Ketten (2 - 7 mg) wurden in verdünntem Ammoniak gelöst und mit 3% TosPheCH₂Cl behandeltem Trypsin (Worthington, EC 3.4.21.4.) 90 min bei pH 10.8 inkubiert. Nach Absenken des pH-Wertes auf 8.5 mit verdünnter Essigsäure wurden weitere 3% Trypsin hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach insgesamt drei Stunden durch Titration auf pH 3.5 beendet. Die jeweiligen Core-Fractionen- ausgefallen bei pH 5.6 - wurden abzentrifugiert und bei -68°C, die löslichen Peptide bei 0°C aufbewahrt.

6.2.2. Chemische Spaltung ⁽¹⁶⁾

10 mg nativer Kette wurden einer säurehydrolytischen Spaltung der Asp-Pro-Bindung in 6 M Guanidin/70% Ameisensäure unterzogen (46 Std. bei 42°C). Das Prohyl-Peptid wurde über Sephadex G50 fine abgetrennt und auf einer Säule aus Biogel P2 (1.6 x 90 cm) mit 10%-iger Ameisensäure entsalzt (Flußrate 35 ml/h).

6.3. Trennung der Peptide

6.3.1. TSK-Gelchromatographie

Die löslichen tryptischen Peptide wurden auf TSK-Gel, Typ G 2000 SW (Tojo Soda, 600 x 4.6 mm) fraktioniert. Es wurde isokratisch mit 0.1%-iger, wässriger Trifluoressigsäure bei einem Durchfluß von 0.7 ml/min eluiert. Detektion erfolgte bei 230 nm.

6.3.2. HPLC⁽¹⁷⁾

Die löslichen tryptischen Peptide wurden direkt bzw. nach Trennung über TSK-Gel auf folgenden reversed phase Säulenmaterialien getrennt:

- LiChrosorb RP 2 (Merck, Darmstadt) mit 0.05 M Ammoniumacetat oder 0.1%-iger Trifluoressigsäure als wässrige Phase,
- LiChrosorb RP 18 (Merck, Darmstadt) mit 0.1%-iger Trifluoressigsäure als wässrige Phase,
- Vydak RP 18 weitporiges Material (Macherey&Nagel) mit 0.1%-iger Trifluoressigsäure als Eluent.

Als organische Phase wurde Acetonitril (= B) verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei 230 nm. Die gewählten Gradienten-Programme sind den Legenden der Abbildungen zu entnehmen. Die Core-Fractionen wurden in 0.1%-iger TFA gelöst. Trennung erfolgte auf RP 2 mit 0.1%-iger TFA als wässrige Phase.

6.4. Reinheitsprüfung der Peptide

6.4.1. Dünnschichtelektrophorese

Die Wanderung der Peptide im elektrischen Feld gemäß ihrer Nettoladung bei pH 5.4 wurde mittels Flachbett-Elektrophorese untersucht. Getrennt wurde auf DC-Fertigplatten aus Cellulose (0.1 x 10 x 20 cm, Merck, Darmstadt) mit Fluoreszenzindikator. Als Puffer diente eine wässrige Lösung aus 5% Pyridin und 5% Aceton (pH 5.4, eingestellt mit Essigsäure).

Die Peptide wurden mit Ninhydrin (60% abs. Ethanol, 20% Eisessig, 8% Collidin, 0.1% Ninhydrin)

detektiert ⁽¹⁸⁾. Definierte Seitenketten wurden durch spezifische Farbtests nachgewiesen: Arginine durch Phenanthrenchinonreaktion ⁽¹⁹⁾, Tryptophane durch Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd ⁽²⁰⁾ und Tyrosine/Histidine durch Diazotierung mit Sulfanilsäure und Natriumnitrit ⁽²¹⁾.

6.4.2. Analysen

Die Bruttoformeln ⁽²²⁾ wurden durch Hydrolyse von je 2 nmol Peptid mit 5.7 N HCl bei 110°C im Vakuum ermittelt (20 bzw 200 Std.). Tryptophan-haltige Peptide wurden in Gegenwart von 6% Thioglycolsäure ⁽²³⁾, Methionin- bzw. Cystein-haltige Peptide nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt.

Das Hydrolysat wurde im automatischen Aminosäureanalysator der Firma Biotronik LC 5000 säulenchromatographisch über eine sulfonierte Polystyrolmatrix als stationäre Phase untersucht. Die in Citratpuffer (pH 2.2) gelösten Proben wurden mit diskontinuierlichen pH- (fünf Puffer von pH 3.54 bis pH 10.5) und Temperatur- (von 48 - 70°C) Gradienten eluiert. Gemäß ihrer Retentionszeit wurden zuerst die sauren, dann die basischen Aminosäuren detektiert. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 0.3 N NaOH regeneriert.

6.5. Sequenzanalyse

Die Sequenzen wurden in automatischen Flüssigphasen-Sequenzatoren (Fa. Beckmann, Typen 890 B, 890 C und 890 C II) nach Edman und Begg⁽²⁴⁾ mit 10 - 25 nmol Peptid und teilweise in einem Gasphasen-Sequenzator⁽²⁵⁾ nach Hunkapilliar und Hood⁽²⁶⁾ mit 1 - 3 nmol Peptid abgebaut. Im Flüssigphasensequenzator kamen das Quadrol-Programm^(24,27) (0.15 M Quadrol als Kupplungspuffer; Anwendung für kleine Lysylpeptide, wobei Lysine mit Reagens IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure, Na-Salz⁽²⁸⁾ blockiert wurden) und das Propin-Programm⁽²⁹⁾ (1.25 M Diethylaminopropin, pH 9.0 als Kupplungspuffer; Anwendung für lange, hydrophobe Peptide und hydrophile Peptide bis 4 Aminosäuren; lange hydrophobe Peptide wurden mit Reagens I = 4-(Isothiocyanato)-benzolsulfonsäure, Na-Salz⁽³⁰⁾ umgesetzt) zur Anwendung. Konversion erfolgte im Autokonverter (Sequemat P-6 Kontron Technik GmbH) mit 3 M TFA bei 60°C bzw. manuell bei 80°C.

Die PTH-Derivate der Aminosäuren (ca. 1 nmol) wurden über HPLC mit zwei Elutionssystemen analysiert:

I: Stufengradientenelution⁽³¹⁾ (HPLC: 1084B Liquid Chromatograph, Fa. Hewlett Packard) bei 60°C
Säule : ODS-Hypersil (RP 18), Shandon; 4.6 x 250 mm

Flußrate : 1.2 ml/min

Puffer A : 10 mM Ammoniumacetat, pH 4.8

Puffer B : Acetonitril

Stufengradient : Start mit 10% B

nach 1 Min. 20% B

" 5 " 45% B

" 14 " 70% B

" 19 " 10% B

Detektion erfolgte bei 265 nm mit multichromatischem Licht gegen 330 nm. Dabei ergaben Serin und Threonin negative Gipfel.

II: Isokratische Elution⁽³²⁾ (Säule s. System I) bei 60°C

Puffer : 0.0685% 0.01 M Natriumacetat (pH 5.2)

0.0315% Acetonitril

0.5% Dichlorethan

Flußrate: 1.7 ml/min

Detektion erfolgte bei 265 nm, von Serin und Threonin bei 330 nm.

7. Hybridisierung von Hämoglobinen (33)

Ausgangsmaterial waren getrennte Globinketten des Menschen ⁽¹³⁾, des Sperbergeiers und der Streifengans.

Zur Hybridisierung wurden je Kette 0,025 μMol (analytisch) bzw. 0,25 μMol (präparativ) eingesetzt. Äquimolare Mengen pro Kette wurden in 0,1 ml bzw. 1 ml Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 unter Zusatz von Harnstoff (8 molar) gelöst und über eine Säule mit Sephadex G25 medium (0,9 x 12 cm) in 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 entsalzt. Die so erhaltene Globinlösung wurde bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom auf 1 ml eingeengt.

Hybridisierung erfolgte durch Zugabe eines 1,6 fachen Überschusses einer 1 mM Häminlösung (0,04 bzw. 0,4 ml) und zehnminütiger Inkubation bei 4°C. Anschließend wurde über eine Säule mit Sephadex G25 fine (0,9 x 12 cm) in 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, freies Häminchlorid abgetrennt. Das gelöste Hybridhämoglobin wurde gegen bidestilliertes Wasser (pH 8,0 mit verd. Ammoniak) wiederholt dialysiert und danach lyophilisiert.

Reinheitskontrolle erfolgte über elektrophoretische und photometrische (UV-Kurve) Methoden.

C: E R G E B N I S S E

8. *Anser anser* (Graugans) und *Anser indicus* (Streifengans)

8.1. Komponententrennung

Die Elektrophorese zeigt drei Komponenten: neben einer langsam wandernden Hauptkomponente liegen zwei schnell anodisch wandernde Nebenkomponten vor. Dieses Ergebnis wird durch die Komponententrennung bestätigt: die konventionelle Methode über CM-Sephadex C-50 erlaubt nur eine Aussage über das Vorliegen multipler Nebenkomponten, nicht über die exakte Zusammensetzung. Ferner ist infolge der langen Versuchszeit der Grad der Denaturierung meist hoch, so daß die Ausbeuten 50% nicht überschreiten. Das Hämoglobin wird in der cyanidligandierten Met-Form erhalten.

Die neu entwickelte Methode mittels FPLC über einen Kationenaustauscher (TSK SP-5PW) zeigt zwei Minorkomponten (s. Abb. 1; Trennung des Hämolyates der Graugans analog).

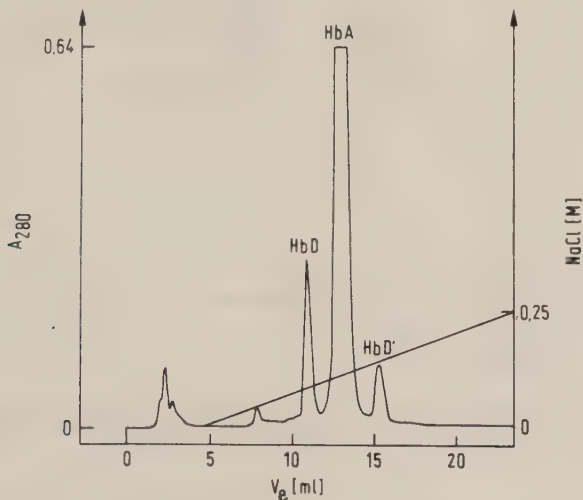


Abb. 1: Chromatogramm des Hämolyates der Streifengans auf einem Kationenaustauscher

Methode : FPLC
stationäre Phase : TSK SP-5PW (8 x 75 mm)
mobile Phase : A: 5 mM NaH_2PO_4 , 4 mM Na_2HPO_4 , pH 6.75
 B: 2 mM NaH_2PO_4 , 7 mM Na_2HPO_4 , 1 M NaCl, pH 6.75
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 10% B in 5 min, von 10 - 25% B in 30 min
Durchfluß : 0.5 ml/min
Detektor : UV 280 nm
Probe : 5 mg Hb in 0.2 ml Lysat

Die Komponenten werden in reiner Form mit einer Ausbeute von 80% erhalten. Nach den UV-Spektren liegen die Hämoglobine in der für physiologische Messungen günstigen Oxy-Form vor.

Die Methode spricht empfindlich auf geringe Unterschiede in der Ladung der Oberfläche des Moleküls an. Es wird deutlich, daß Hb D bei Vögeln leichter strukturellen Veränderungen unterliegt als Hb A, da dessen Elutionsprofil bei älteren Blutproben Asymetrien aufweist. Die Natur dieser Veränderungen ist nicht bekannt.

Ferner zeigt dieses Verfahren, daß der isoelektrische Punkt der Hämoglobine der Vögel zwischen pH 8 und pH 9 liegt, da bei Chromatographie über einen Anionenaustauscher (DEAE SPW) keine Bindung der Hämoglobine erfolgt (s. Abb.2).

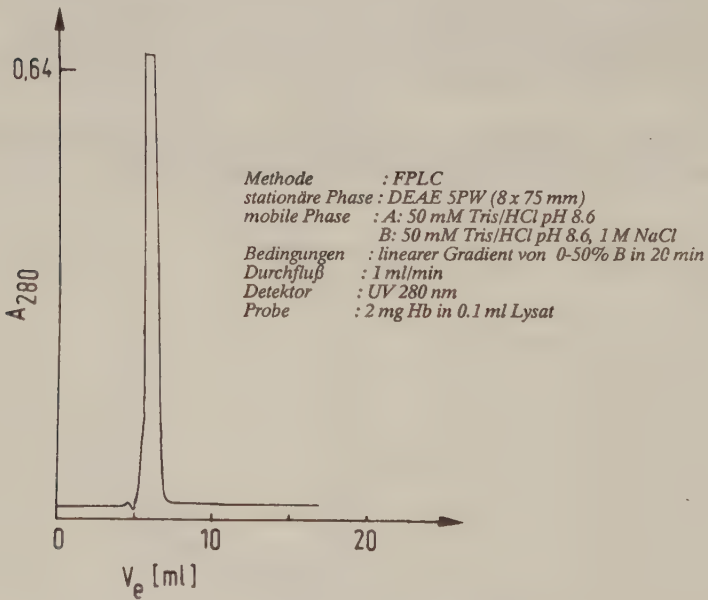


Abb.2: Chromatogramm des Hämolysates der Graugans auf einem Anionenaustauscher

Das für den Kationenaustauscher entwickelte Programm kann für die Hämoglobine der Vögel universell angewendet werden; somit sind schnelle und eindeutige Untersuchungen von Blutproben möglich.

Das Globin besteht zu 80% aus Hb A (*A.anser*, *A.indicus*) und zu 10% (*A.anser*) bzw. 11% (*A.indicus*) aus Hb D. Die weitere Minorkomponente wird als Hb D' nach der Homologie des N-Terminus zu den α^D -Ketten bezeichnet; sie liegt zu ca. 5% vor und kann nur in frischen

N-Terminus zu den α^D -Ketten bezeichnet; sie liegt zu ca. 5% vor und kann nur in frischen Blutproben nachgewiesen werden, da sie offensichtlich instabil ist; auch werden je nach Herkunft unterschiedliche Konzentrationen gefunden.

8.2. Kettentrennung

Die Elektrophorese zeigt vier getrennte Ketten, wobei die β -Ketten die geringste, die $\alpha^{D'}$ -Ketten die weiteste Strecke in Richtung Kathode zurücklegen. Je nach Lagerungsdauer des Blutes spalten die α^D -Ketten in zwei Banden auf.

Die konventionelle Methode über CM-Cellulose unter denaturierenden Bedingungen ist für eine Trennung der Nebenkomponten zu unempfindlich. Deshalb ist das Verfahren mittels HPLC vorzuziehen, welches eine Trennung der α^D - und $\alpha^{D'}$ -Ketten erlaubt (s. Abb. 3);

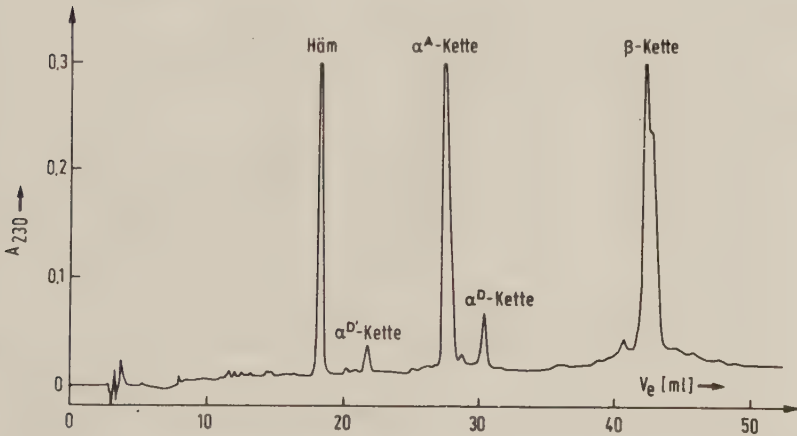


Abb. 3: Chromatogramm des Hämolyates der Graugans auf einer Umkehrphase unter dissoziierenden Bedingungen

Methode : HPLC
stationäre Phase : Nucleosil-C₄ 7 μ m Korngröße (4.6 x 250 mm)
mobile Phase : A: 0.1% Trifluoressigsäure
 B: Acetonitril + 0.1% TFA
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 40% B in 2 min, von 40 - 60% B in 60 min
Durchfluß : 1 ml/min
Detektor : UV 230 nm
Probe : 2 mg Hb in 0.1 ml Lysat mit 30% TFA

Vorteilhaft ist, daß das Hämolyat nach Ansäuern mit TFA direkt auf die Säule aufgetragen werden kann; mögliche Nebenreaktionen bei der Abspaltung der prosthetischen Gruppe sind dadurch minimiert. Die Ausbeuten liegen bei 80%.

8.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^D -Ketten

Die α^D -Ketten sind in oxidiert, denaturierter Form dem Enzym Trypsin leicht zugänglich. Selbst die schwer hydrolysierbare Peptidbindung zwischen Tp 12b und Tp 13 ist nach drei Stunden vollständig gespalten. Trotz hoher Konzentrationen des Enzyms ist keine chymotryptische Nebenaktivität nachgewiesen worden. Die Aufarbeitung zeigt Abb. 4.

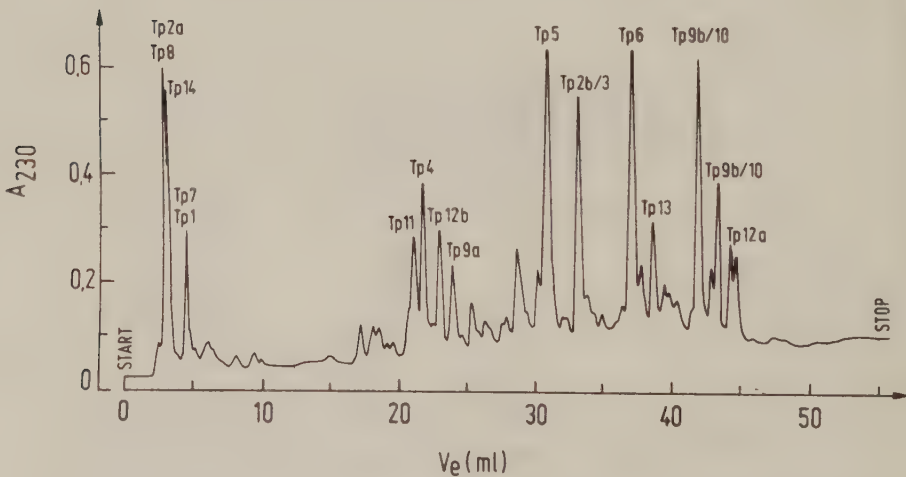


Abb. 4: Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten α^D -Ketten aus Hb D der Graugans auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC
stationäre Phase : LiChrosorb RP 2, 7 μ m Korngröße (4.6 x 250 mm)
mobile Phase : A: 0.05 M Ammoniumacetat, pH 6.0
 B: Acetonitril
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 40% B in 40 min
Durchfluß : 1 ml/min
Detektor : UV 230 nm
Probe : 2 mg gesplattene Kette in 1 ml Lösung

Alle Peptide lassen sich direkt isolieren mit Ausbeuten von 60% (Tp 12a mit 30%-iger Ausbeute, da infolge der Hydrophobizität ein Teil als Core-Fraktion vorliegt). Die Peptide Tp 2a und Tp 8, sowie Tp 7 und Tp 1 sind über LiChrosorb RP 18 mit 0.1% TFA als Eluent isoliert worden (linearer Gradient von 0-40% Acetonitril in 20 min und von 40-60% in 6 min).

Die in Abb. 5 gezeigte Fraktionierung der Peptide führt zu Ausbeuteverlusten (ca. 50%).

Von den $\alpha^{D'}$ -Ketten der Grau- und Streifengans wurden 42 Reste sequenziert.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tab. 1-2 gegeben.

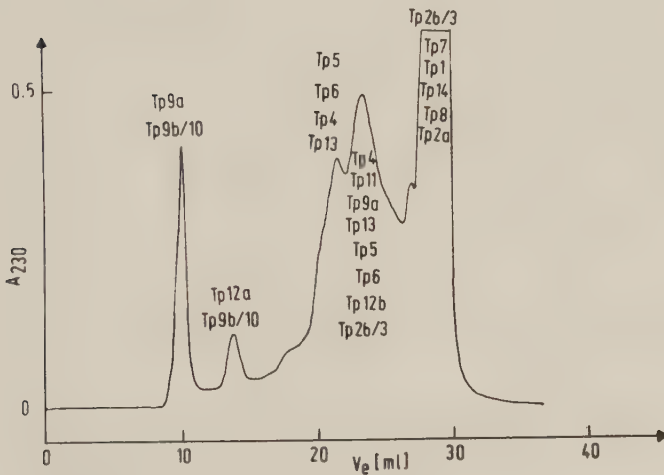


Abb. 5: gelchromatographische Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten α^D -Ketten aus Hb D der Graugans

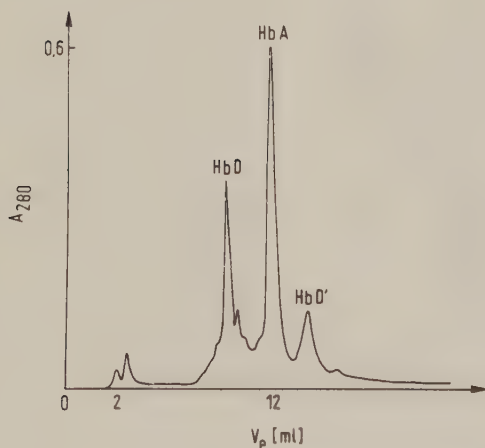
Methode : HPLC
stationäre Phase : TSK-Gel, Typ G 2000 SW (600 x 4.6 mm)
mobile Phase : 0.1% TFA
Bedingungen : isokratisch
Durchfluß : 0.7 ml/min
Detektor : UV 230 nm
Probe : 5 mg gespaltene Kette in 2 ml Lösung

9. *Chloephaga melanoptera* (Andengans)

9.1. Komponententrennung

Die Zusammensetzung des Globins variiert je nach Alter des Tieres. In Proben von einjährigen Gänsen liegen 40% Hb D und 60% Hb A vor. Drei Jahre später enthält Blut derselben Gans 4% Hb D neben Hb A. In beiden Proben ist eine weitere Minorkomponente nachweisbar (Hb D'). Die Ergebnisse der Elektrophorese bestätigen die Komponententrennung mittels FPLC (s. Abb. 6)

a) einjähriges Tier



b) vierjähriges Tier

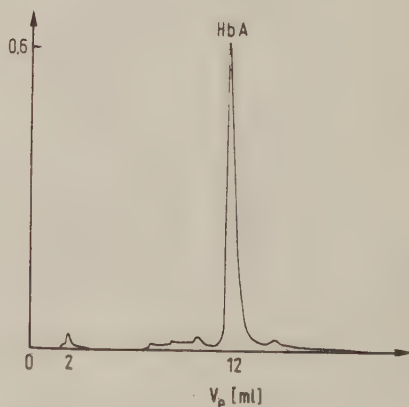


Abb. 6: Chromatogramm des Hämolsates der Andengans auf einem Kationenaustauscher

Methode : FPLC
stationäre Phase : TSK SP-5PW (8 x 75 mm)
mobile Phase : A: 5 mM NaH₂PO₄ 4 mM Na₂HPO₄ pH 6.75
 B: 2 mM NaH₂PO₄ 7 mM Na₂HPO₄ 1 M NaCl, pH 6.75
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 10% B in 5 min, von 10 - 25% B in 30 min
Durchfluß : 0.5 ml/min
Detektor : UV 280 nm
Probe : 3 mg Hb in 0.2 ml Lysat

9.2.Kettentrennung

Die Elektrophorese zeigt drei Globinketten, entsprechend den α^A -, α^D - und β -Ketten. Dies bestätigt die Kettentrennung über CM-Cellulose (s. Abb. 7).

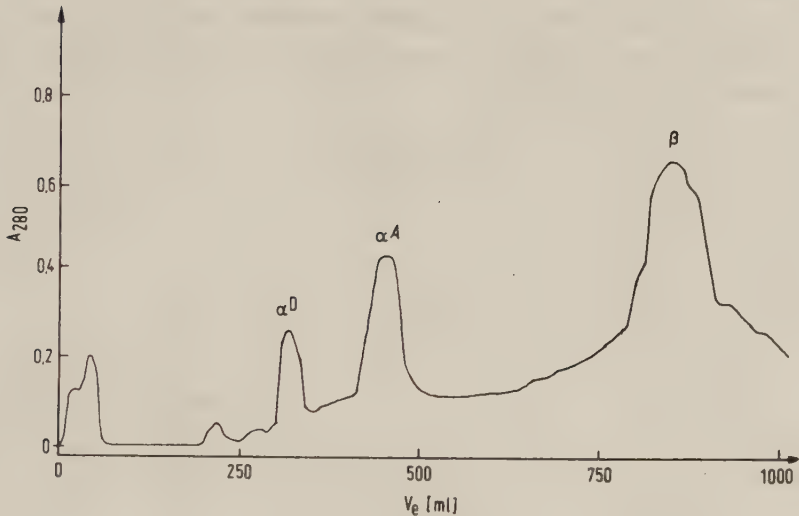


Abb.7: Chromatogramm des Globins der Andengans auf einem Kationenaustauscher

Methode : Säulenchromatographie
 stationäre Phase : CM-Cellulose 52 (Whatman) (2.5 x 17 cm)
 mobile Phase : 8 M Harnstoff, 0.02 M Natriumacetat, 0.01% DTE
 Bedingungen : linearer Gradient von
 0.02 - 0.1 M NaCl, pH 5.0 - 5.8 (600 + 600 ml)
 0.1 - 0.3 M NaCl, pH 5.8 (300 + 300 ml)
 Durchfluß : 30 ml/min
 Detektor : UV 280 nm
 Probe : 200 mg Globin, gelöst in 10 ml Startpuffer

9.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , α^D - und β -Ketten

Die Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten Ketten zeigt Abb. 8.

Bei allen Ketten sind nur die kurzen Peptide (bis vier Aminosäuren) rechromatographiert worden (LiChrosorb RP 18; 0.1% TFA als Eluent; linearer Gradient von 0-40% Acetonitril in 25 min, von 40-60% in 5 min). Aus der Core-Fraktion der β -Ketten - löslich in 0.1% TFA - sind Tp 5/6 und Tp 12 isoliert worden (LiChrosorb RP 2; 0.1% TFA als Eluent; linearer Gradient von 0-35% Acetonitril in 5 min und 35-60% in 20 min). Die Peptidbindung zwischen Tp 10 und Tp 11 der β -Ketten ließ sich unter den angegebenen Bedingungen nicht spalten, so daß das Dipeptid sequenziert wurde.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tab. 3-5 gegeben.

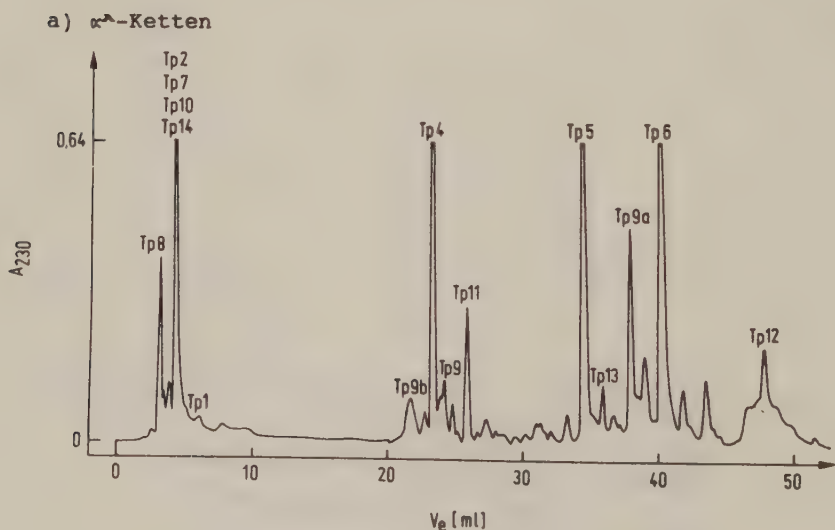


Abb. 8: Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten α^A (a)-, α^D (b)- und β (c)-Ketten aus Hb A und Hb D der Ändengans auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC

stationäre Phase : LiChrosorb RP 2, $7\mu\text{m}$ Korngröße, (4.6 x 250 mm)

mobile Phase : A: 0.05 M Ammoniumacetat, pH 6.0

B: Acetonitril

Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 40% B in 40 min

Durchfluß : 1 ml/min

Detektor : UV 230 nm

Probe : 6 mg gesplattene Kette in 2 ml Lösung

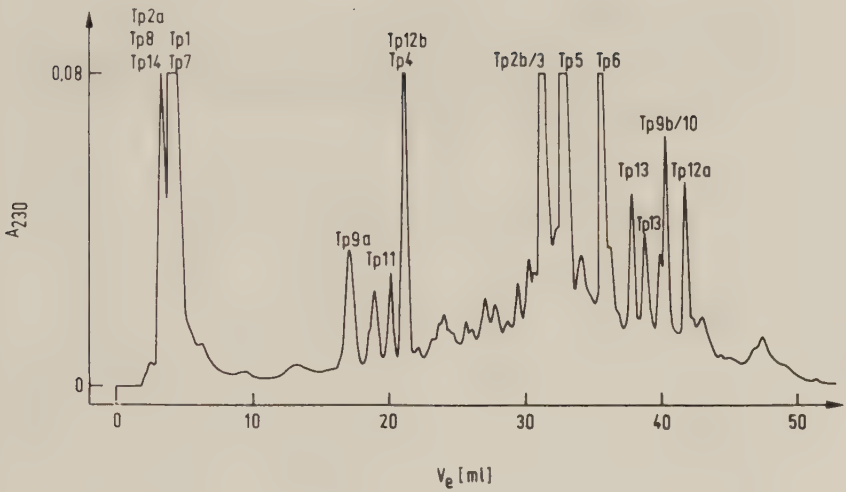
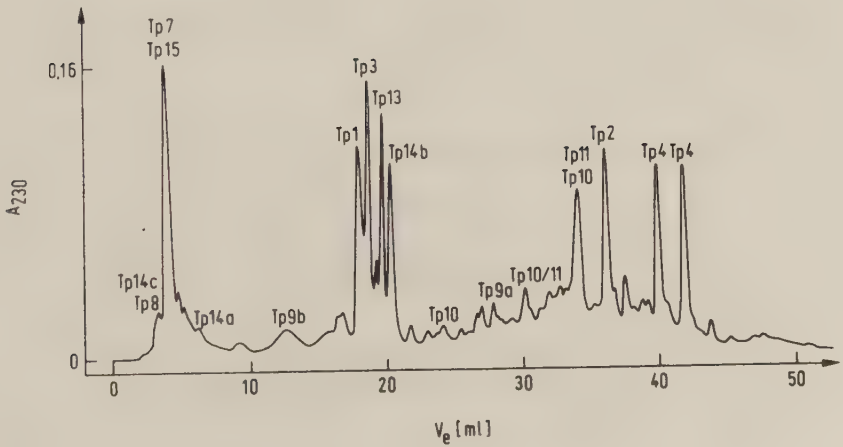
b) α^D -Kettenc) β -Ketten

Abb. 8: Fortsetzung

10. Accipiter gentilis (Habicht)

10.1. Komponententrennung

Die Elektrophorese zeigt zwei Komponenten, welche mittels FPLC getrennt werden können (s. Abb.9). Es liegen 85% Hb A und 15% Hb D vor.

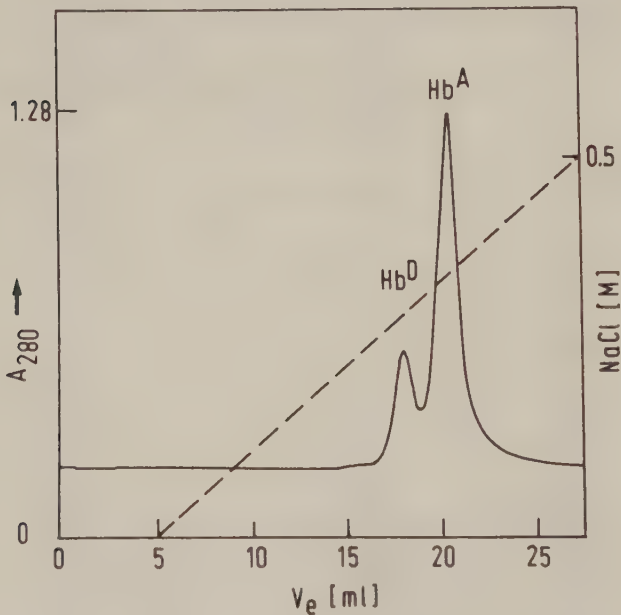


Abb.9: Chromatogramm des Hämolyzates des Habichts auf einem Kationenaustauscher

Methode : FPLC

stationäre Phase : TSK SP-5PW (8 x 75 mm)

mobile Phase : A: 5 mM NaH_2PO_4 , 4 mM Na_2HPO_4 , pH 6.75

B: 2 mM NaH_2PO_4 , 47 mM Na_2HPO_4 , 1 M NaCl, pH 6.75

Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 10% B in 5 min, von 10 - 25% B in 30 min

Durchfluß : 0.5 ml/min

Detektor : UV 280 nm

Probe : 2 mg Hb in 0.1 ml Blut

10.2. Kettentrennung

Da infolge der Hämolyse des Blutes mit der Anwesenheit von Serumproteinen zu rechnen war, ist trotz geringer Menge eine säulenchromatographische Kettentrennung vorgezogen worden (s. Abb. 10). Wie nach der Elektrophorese erwartet, sind drei Ketten isolierbar.

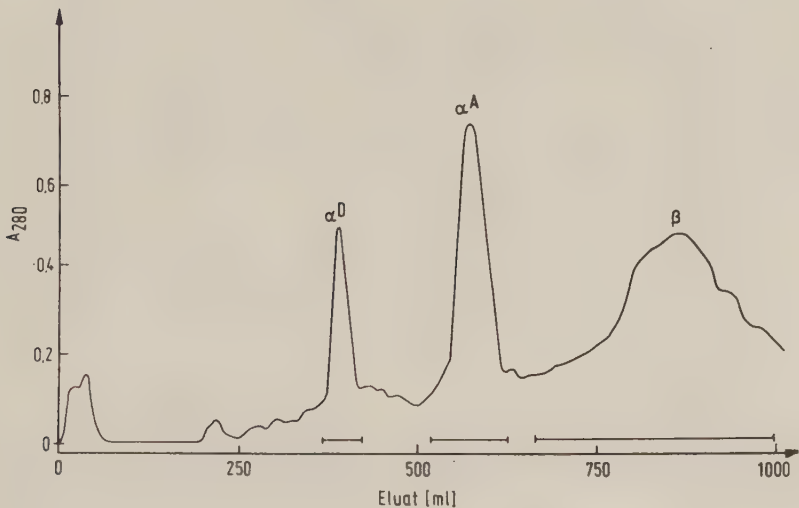


Abb. 10: Chromatogramm des Globins des Habichts auf einem Kationenaustauscher

Methode : Säulenchromatographie
 stationäre Phase : CM-Cellulose 52 (Whatman) (2.5 x 17 cm)
 mobile Phase : 8 M Harnstoff, 0.02 M Natriumacetat, 0.01% DTE, pH 5.3
 Bedingungen : linearer Gradient von
 0.02 - 0.1 M NaCl, (500 + 500 ml)
 0.12 - 0.25 M NaCl, (450 + 450 ml)
 Durchfluß : 30 ml/min
 Detektor : UV 280 nm
 Probe : 80 mg Globin, gelöst in 5 ml Startpuffer

10.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , α^D - und β -Ketten

Das Chromatogramm der tryptischen Spaltung der oxidierten Ketten zeigt Abb. 11.

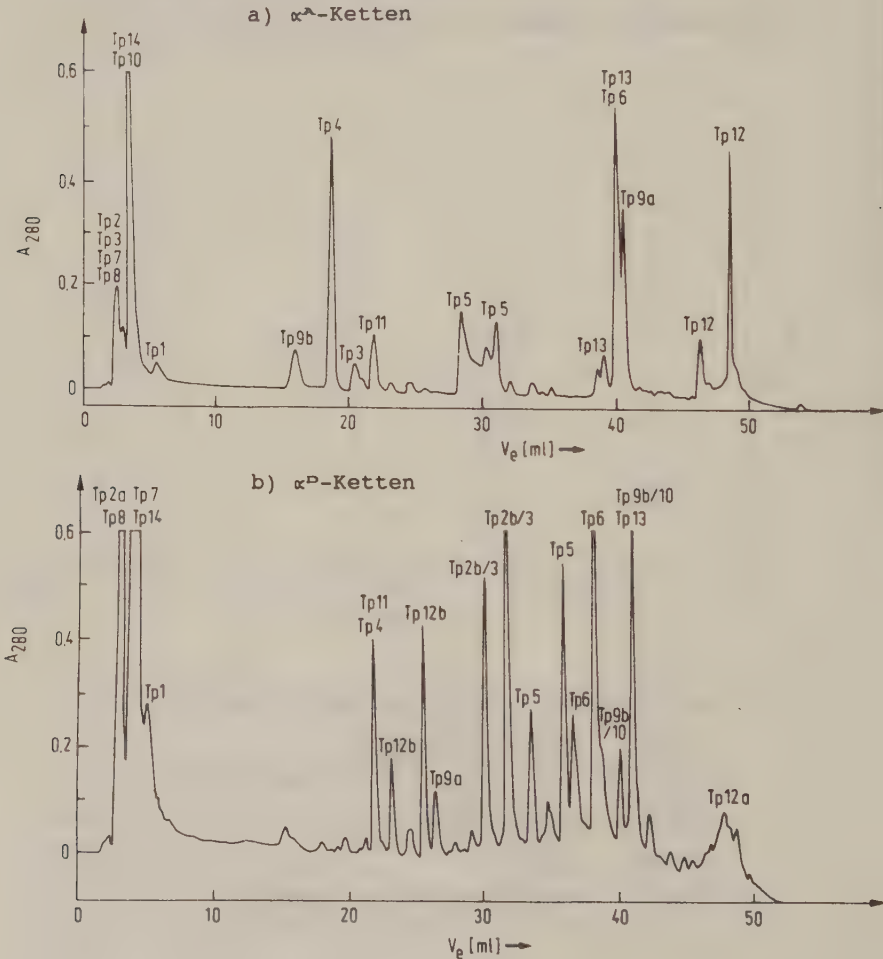


Abb. 11: Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten α^A (a)-, α^D (b)- und β (c)-Ketten aus Hb A und Hb D des Habichts auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC
stationäre Phase : LiChrosorb RP 2, 7 μ m Korngröße, (4,6 x 250 mm)
mobile Phase : A: 0.05 M Ammoniumacetat, pH 6.0
 B: Acetonitril
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 40% B in 40 min
Durchfluß : 1 ml/min
Detektor : UV 230 nm
Probe : 2 mg gespaltene Kette in 1 ml Lösung

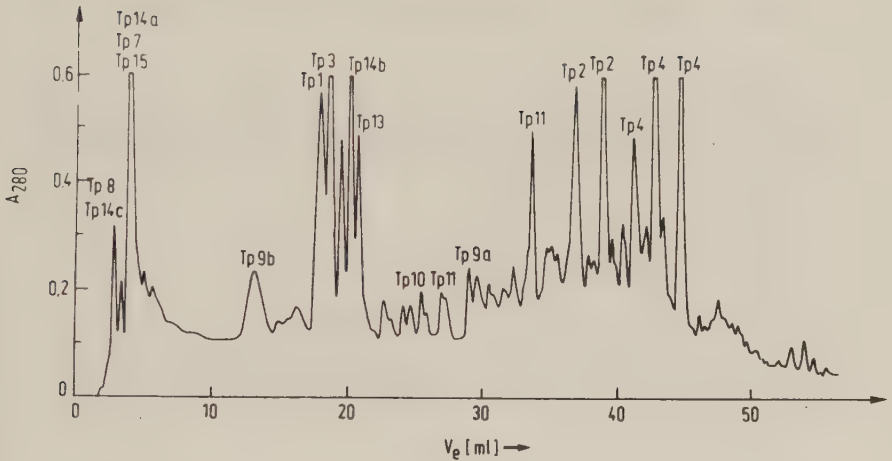
c) β -Ketten

Abb. 11: Fortsetzung

Die Core-Fraktion der β -Ketten ist in 0.1%-iger TFA löslich; über LiChrosorb RP 2 sind Tp 4, Tp 5/6 und Tp 12 isoliert worden (Eluent 0.1% TFA, linearer Gradient von 0-35 % Acetonitril in 5 min und 35-60% in 20 min).

Die Peptide der α^A -Ketten Tp 2, Tp 3, Tp 7, Tp 8 sowie Tp 10 und Tp 14 sind über Lichrosorb RP 18 (0.1% TFA als Eluent; linearer Gradient von 0-40% Acetonitril in 20 min und 40-60% in 6 min) rechromatographiert worden. Nach den gleichen Bedingungen sind Tp 7 und Tp 14 der α^D -Ketten und Tp 14a, Tp 7 und Tp 15 der β -Ketten getrennt worden.

Tp 9b/10 und Tp 13 der α^D -Ketten sind über Vydak RP 18 isoliert worden (0.1% TFA als Eluent; linearer Gradient von 0-35% Acetonitril in 10 min und von 35-60% in 15 min). Über dieselbe stationäre Phase wurden Tp 11 und Tp 4 getrennt (0.1% TFA als Eluent; linearer Gradient von 0-35% Acetonitril in 20 min und von 35-60% in 20 min).

Von den Peptiden der α^A -Ketten sind Tp 6 und Tp 13 über Vydak RP 18 mit 0.1% TFA als Eluent (linearer Gradient von 0-30% Acetonitril in 10 min und von 30-60% in 30 min) rechromatographiert worden.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tab. 6-8 gegeben.

11. *Gyps rueppellii* (Sperbergeier)

11.1. Komponententrennung

Während in der Elektrophorese nur zwei Hämoglobine erkennbar sind, zeigt die Komponententrennung mit FPLC vier Hämoglobine (s. Abb. 12).

Trotz nur geringer Unterschiede in der Ladung werden diese in reiner Form erhalten. Sie sind durch Sequenzieren der N-terminalen Region (42 Schritte) nach Kettentrennung durch HPLC eindeutig identifiziert worden (nachdem die Ergebnisse der Sequenzanalyse vorlagen). Das Ergebnis ist an Blutproben zweier verschiedener Tiere bestätigt worden.

Die Hämoglobine bestehen aus identischen β -Ketten und paarweise homologen α -Ketten. Ihre prozentuale Zusammensetzung in den Erythrocyten beträgt: Hb A 48%, Hb A' 24%, Hb D 16%, Hb D' 9%.

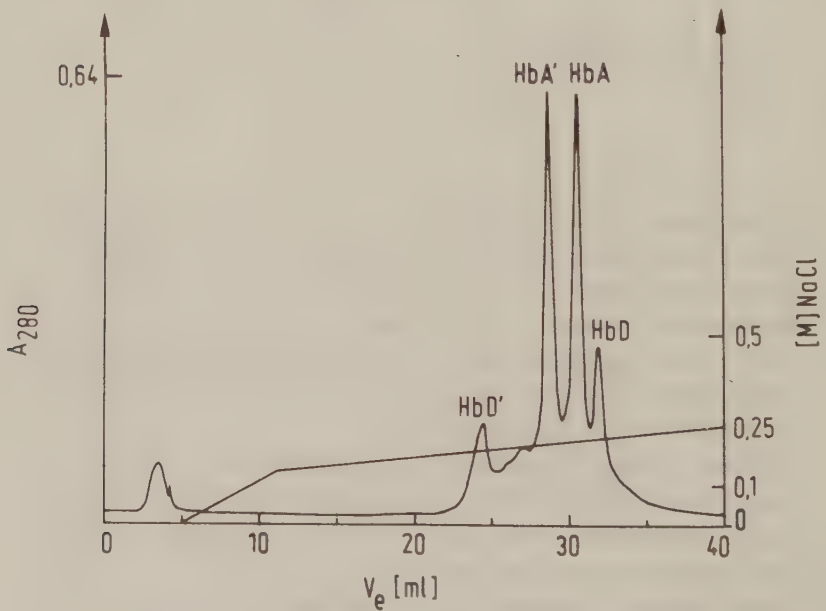


Abb. 12: Chromatogramm des Hämolyrates des Sperbergeiers auf einem Kationenaustauscher

Methode : FPLC
 stationäre Phase : TSK SP-5PW (8 x 75 mm)
 mobile Phase : A: 5 mM NaH₂PO₄, 4 mM Na₂HPO₄, pH 6.75
 B: 2 mM NaH₂PO₄, 7 mM Na₂HPO₄, 1 M NaCl, pH 6.75
 Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 10% B in 5 min, von 10 - 25% B in 30 min
 Durchfluß : 0.5 ml/min
 Detektor : UV 280 nm
 Probe : 2 mg Hb in 0.1 ml Blut

11.2. Kettentrennung

Kettentrennung führt weder auf CM-Cellulose noch mit Umkehrphasen zu einer Trennung der paarweise homologen α -Ketten; das Verfahren der Säulenchromatographie über CM-Cellulose hat den Vorteil der größeren Auftragsmenge. Die α^A - und $\alpha^{A'}$ - bzw. α^D - und $\alpha^{D'}$ -Ketten eluieren jeweils in einem Gipfel (s. Abb. 13).

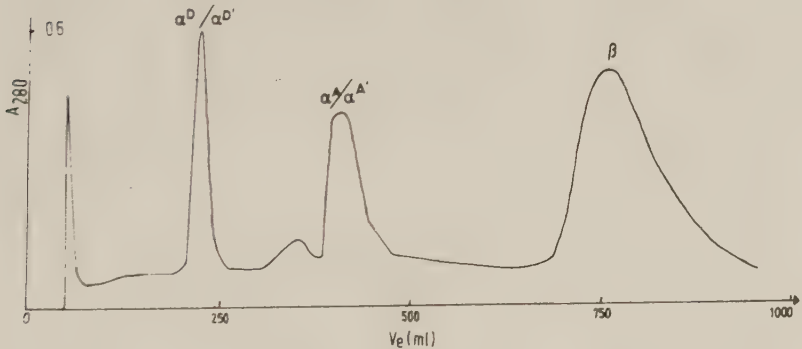


Abb. 13: Chromatogramm des Globins des Sperbergeiers auf einem Kationenaustauscher

Methode : Säulenchromatographie
stationäre Phase : CM-Cellulose 52 (Whatman) (2.5 x 17 cm)
mobile Phase : 8 M Harnstoff, 0.02 M Natriumacetat, 0.01% DTE, pH 5.3
Bedingungen : linearer Gradient von
 0.02 - 0.1 M NaCl, (500 + 500 ml)
 0.12 - 0.25 M NaCl, (450 + 450 ml)
Durchfluß : 30 ml/min
Detektor : UV 280 nm
Probe : 180 mg Globin, gelöst in 10 ml Startpuffer

11.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A -, $\alpha^{A'}$ -, α^D -, $\alpha^{D'}$ - und β -Ketten

Die Trennung der tryptischen Peptide aller Ketten zeigt Abb. 14. Obwohl die paarweise homologen α -Ketten nicht getrennt waren, ließen sich die differierenden Peptide (Tp 5 in $\alpha^A/\alpha^{A'}$ und Tp 12a in $\alpha^D/\alpha^{D'}$) isolieren und aufgrund der Ausbeuten den jeweiligen Ketten zuordnen.

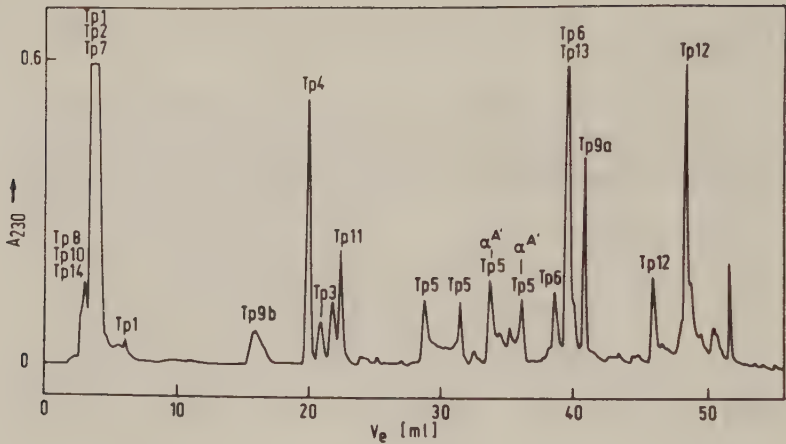
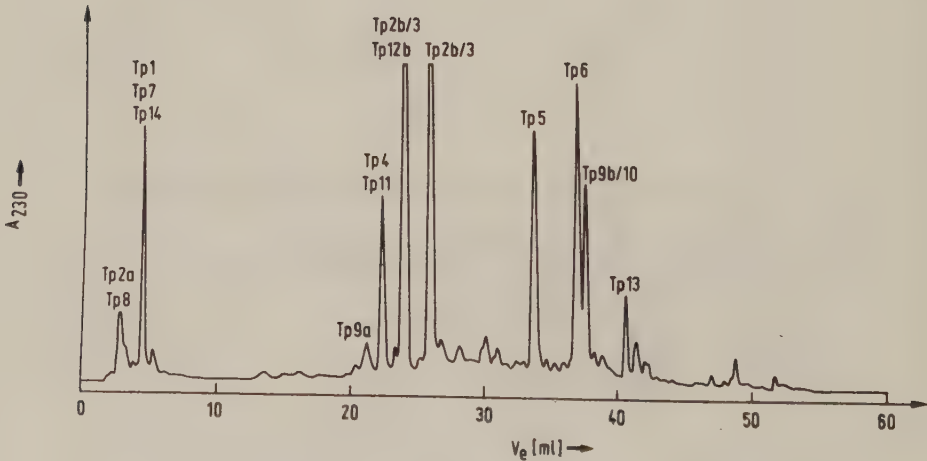
a) $\alpha^A/\alpha^{A'}$ -Kettenb) $\alpha^D/\alpha^{D'}$ -Ketten

Abb. 14: Trennung der tryptischen Peptide der oxidierten α^A - und $\alpha^{A'}$ (a)-, α^D - und $\alpha^{D'}$ (b)- sowie der β (c)-Ketten aus Hb A, Hb A', Hb D und Hb D' des Sperbergeiers auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC

stationäre Phase : LiChrosorb RP 2, 7 μ m Korngröße, (4,6 x 250 mm)

mobile Phase : A: 0.05 M Ammoniumacetal, pH 6.0

B: Acetonitril

Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 40% B in 40 min

Durchfluß : 1 ml/min

Detektor : UV 230 nm

Probe : 5 mg gesplaltene Kette in 2 ml Lösung

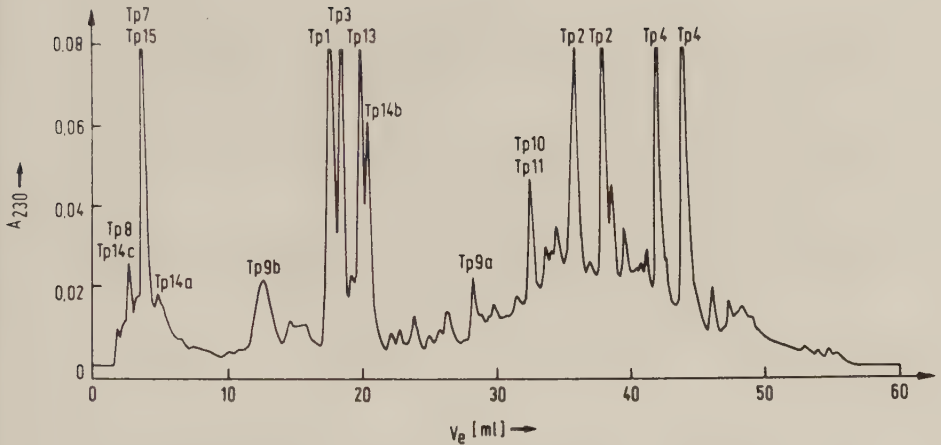
c) β -Ketten

Abb. 14: Fortsetzung

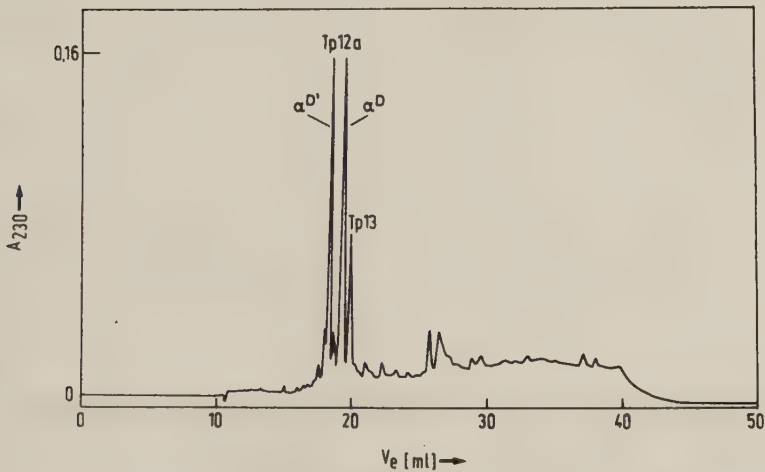


Abb. 15: Chromatogramm der Core-Fraktion der tryptisch gespaltenen α^D -/ $\alpha^{D'}$ -Ketten aus Hb D/Hb D' des Sperbergeiers auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC

stationäre Phase : LiChrosorb RP 2, 7 μ m Korngröße, (4,6 x 250 mm)

mobile Phase : A: 0.05 M Ammoniumacetat, pH 6.0

B: Acetonitril

Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 30% in 10 min, von 30 - 60% B in 30 min

Durchfluß : 1 ml/min

Detektor : UV 230 nm

Die Core-Fraktion der $\alpha^D/\alpha^{D'}$ -Ketten - löslich in 10%-igem Ammoniak - enthält die Peptide Tp 12 und Tp 13 (s. Abb. 15), die der β -Ketten - löslich in 0.1%-iger TFA - die Peptide Tp 4, Tp 5/6, Tp 12 und Tp 13 (s. Abb. 16). Die kurzen Peptide der Ketten (bis vier Aminosäuren) sind über LiChrosorb RP 18 rechromatographiert worden (s. Abb. 17 für die $\alpha^D/\alpha^{D'}$ -Ketten). Dabei konnte auch das chymotryptische Peptid aus der Spaltung von Tp 9b/10 zwischen Tyrosin und Asparagin (Pos. 89/90) der $\alpha^D/\alpha^{D'}$ -Ketten isoliert werden. Über Vydak RP 18 sind Tp 11 und Tp 4 der $\alpha^D/\alpha^{D'}$ -Ketten rechromatographiert worden (0.1% TFA als Eluent; linearer Gradient von 0-35% Acetonitril in 20 min und von 35-60% in 20 min). Tp 2b/3 und Tp 12b der $\alpha^D/\alpha^{D'}$ -Ketten sind über Vydak RP 18 isoliert worden (s. Abb. 18).

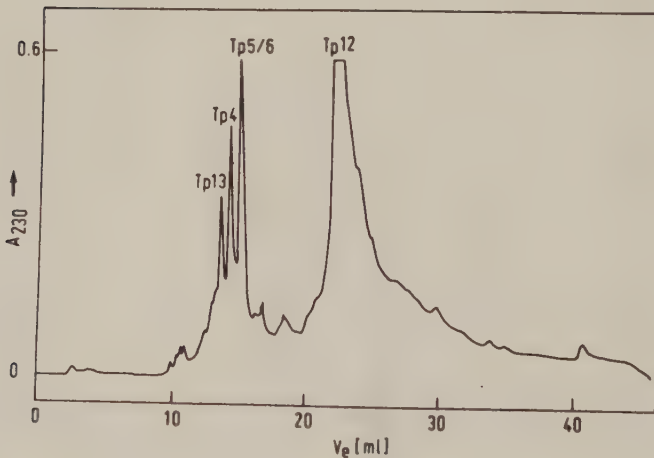


Abb.16: Chromatogramm der Core-Fraktion der tryptisch gespaltenen β -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC
stationäre Phase : LiChrosorb RP 2, 7 μ m Korngröße, (4.6 x 250 mm)
mobile Phase : A: 0.1% Trifluoressigsäure
 B: Acetonitril + 0.1% TFA
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 35% B in 5 min von 35 - 60% B in 30 min
Durchfluß : 1 ml/min
Detektor : UV 230 nm

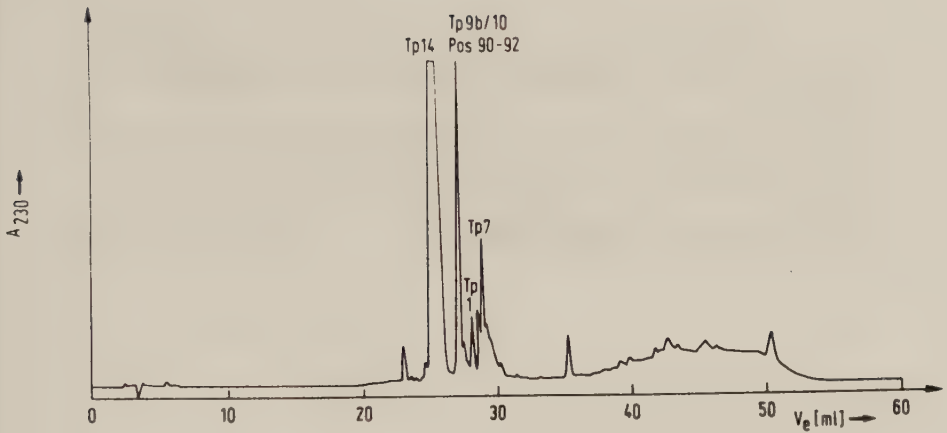


Abb. 17: Rechromatographie der tryptischen Peptide Tp 14, Tp 1 und Tp 7 sowie, des chymotryptischen Peptids Tp 9b/10 (Pos. 90-92) der α - α' -Ketten aus Hb D/Hb D' des Sperbergeiers auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC
 stationäre Phase : LiChrosorb RP 18, 7 μ m Korngröße, (4.6 x 250 mm)
 mobile Phase : A: 0.1% Trifluoressigsäure
 B: Acetonitril + 0.1% TFA
 Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 30% B in 40 min, von 30 - 60% B in 5 min
 Durchfluß : 1 ml/min
 Detektor : UV 230 nm

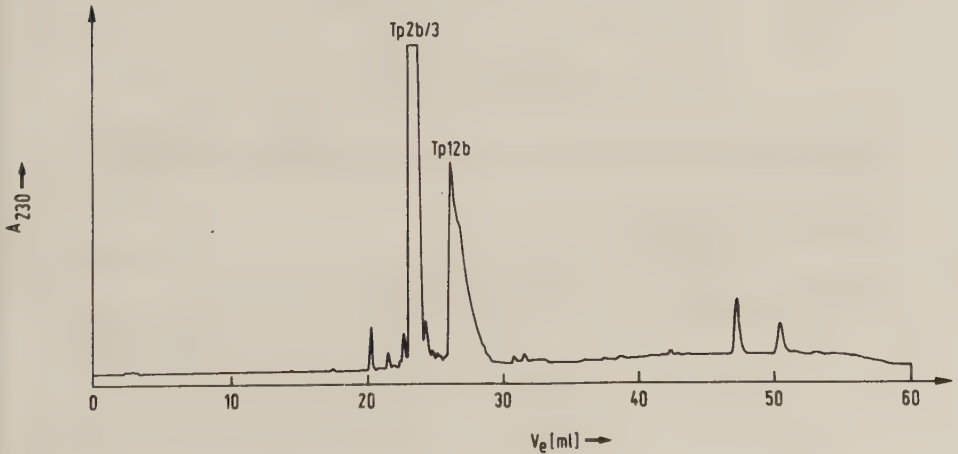


Abb. 18: Rechromatographie der tryptischen Peptide Tp 2b/3 und Tp 12b der α - α' -Ketten aus Hb D/Hb D' des Sperbergeiers auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC
 stationäre Phase : Vydak RP 18
 mobile Phase : A: 0.1% Trifluoressigsäure
 B: Acetonitril + 0.1% TFA
 Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 10% B in 4 min, von 10 - 60% B in 30 min
 Durchfluß : 1 ml/min
 Detektor : UV 230 nm

Von den Peptiden der α^A/α^A -Ketten sind Tp 6 und Tp 13; über Vydak RP 18 mit 0.1% TFA als Eluent (linearer Gradient von 0-30% Acetonitril in 10 min und von 30-60% in 30 min) rechromatographiert worden.

Tp 10 und Tp 11 der β -Ketten sind über Vydak RP 18 rechromatographiert worden (s. Abb. 19). Die Peptide Tp 2 und Tp 4 eluieren in mehreren Gipfeln aufgrund oxidativer Veränderungen an Tryptophan⁽³⁴⁾.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tab. 9-13 gegeben.

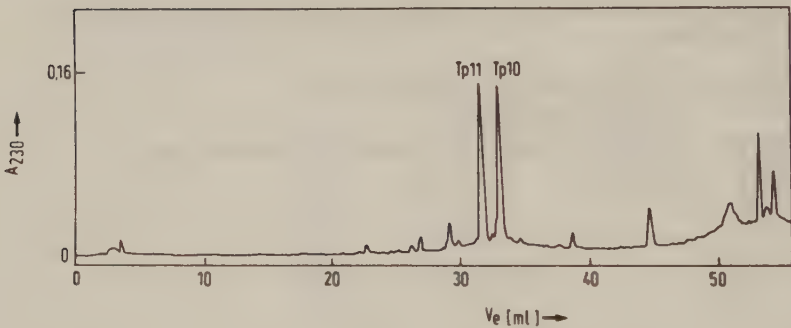


Abb. 19: Rechromatographie der tryptischen Peptide Tp 10 und Tp 11 der β -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers auf einer Umkehrphase

Methode : HPLC
stationäre Phase : Vydak RP 18
mobile Phase : A: 0.1% Trifluoressigsäure
 B: Acetonitril + 0.1% TFA
Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 40% B in 40 min, von 40 - 60% B in 5 min
Durchfluß : 1 ml/min
Detektor : UV 230 nm

12. *Trigonoceps occipitalis* (Wollkopfgeier)

12.1. Komponententrennung

Sowohl die Elektrophorese als auch die Chromatographie des Hämolyats über einen Kationenaustauscher (s. Abb. 20) zeigen zwei Komponenten, Hb A und Hb D (70%:30%).

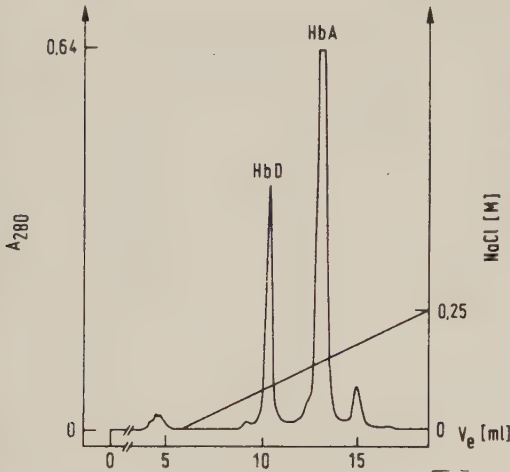


Abb. 20: Chromatogramm des Hämolyates des Wollkopfgeiers auf einem Kationenaustauscher

Methode : FPLC
 stationäre Phase : TSK SP-5PW (8 x 75 mm)
 mobile Phase : A: 5 mM NaH₂PO₄, 4 mM Na₂HPO₄, pH 6.75
 B: 2 mM NaH₂PO₄, 7 mM Na₂HPO₄, 1 M NaCl, pH 6.75
 Bedingungen : linearer Gradient von 0 - 10% B in 5 min, von 10 - 25% B in 30 min
 Durchfluß : 0.5 ml/min
 Detektor : UV 280 nm
 Probe : 2 mg Hb in 0.1 ml Blut

12.2. Kettentrennung

Die Ketten sind über CM-Cellulose unter den gleichen Bedingungen wie die des Sperbergeiers isoliert worden (vgl. Abb. 13).

12.3. Tryptische Spaltung der oxidierten α^A , α^D - und β -Ketten

Es fanden dieselben Bedingungen wie zur Isolierung der tryptischen Peptide des Sperbergeiers Anwendung (vgl. Abb. 14-19).

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tab. 14-16 gegeben.

13. Hybridisierung von Hämoglobinen

Die Hybride werden in unterschiedlichen Ausbeuten erhalten, infolge der geringen Löslichkeit der β -Ketten der Vögel. Das Elutionsprofil zeigt Abb. 21. Im folgenden ist ein Überblick über die Ausbeuten gegeben:

	Human α	Human β
Sperbergeier $\alpha^A/\alpha^{A'}$	—	55%
Sperbergeier $\alpha^D/\alpha^{D'}$	—	70%
Sperbergeier β	35%	—
Streifengans α^A	—	49%
Streifengans α^D	—	60%
Human β	80%	—

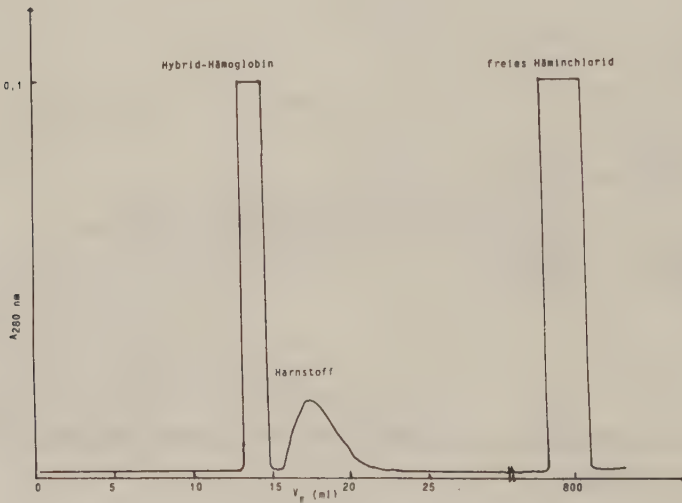


Abb. 21: Elutionsprofil der Entsalzung des Hybridhämoglobins

Methode : Säulenchromatographie
 stationäre Phase : Sephadex G-25 fine (0.9x12 cm)
 mobile Phase : 0.01 M Tris/HCl, pH 8.0
 Bedingungen : isokratisch
 Durchfluß : 5 ml/min
 Detektor : UV 280 nm
 Probe : je 0.025 μ mol entsalzte Kette (Human β / Streifengans α^A)
 in 0.01 M Tris/HCl, pH 8.0 unter Zugabe von 0.4 ml 1mM Häminklösung

14. Ergebnisse der Sequenzanalyse

Die folgenden Abb.22-28 zeigen die Primärstrukturen der sequenzierten Hämoglobine. Es wurden N-terminal 42 Schritte, sowie die tryptischen Peptide jeder Kette sequenziert. Die Bezeichnungen A : H geben die helikalen Bereiche an. Zuordnung der tryptischen Peptide erfolgte durch Homologie zu den jeweils angegebenen Vergleichssequenzen.

Tab. 1: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^D -Ketten der Hämoglobine der Graugans (Anser anser). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	1p1 1-7	1p2a 8	1p2b/3 9-16	1p4 17-31	1p5 32-40	1p6 41-56	1p7 57-60	1p8 61
Asx	2.01	--	--	1.98	--	1.04	--	--
Thr	0.89	--	--	--	1.87	0.89	--	--
Ser	--	--	--	--	--	0.86	0.84	--
Glx	--	--	1.82	3.79(4)	1.31	1.92	--	--
Pro	--	--	--	--	1.01	2.22	--	--
Gly	--	--	--	2.01	--	1.20	1.19	--
Ala	1.14	--	1.17	2.04	--	--	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	1.07	1.10	1.00	--	--
Met	0.64(1)	--	--	--	0.64(1)	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.16	--	2.54(3)	1.27	--	1.35	--	--
Tyr	--	--	--	--	1.02	0.89	--	--
Phe	--	--	--	1.05	1.15	1.85	--	--
His	--	--	--	1.02	--	2.00	1.04	--
Trp	--	--	1.32	--	--	--	--	--
Lys	0.99	1.00	1.04	--	1.09	--	0.93	1.00
Arg	--	--	--	0.86	--	0.78	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	1p9a 62-71	1p9b/10 72-92	1p11 93-99	1p12a 100-115	1p12b 116-127	1p13 128-139	1p14 140-141	Ketten- analyse
Asx	1.18	4.00	1.84	--	2.07	--	--	14.14(14)
Thr	--	--	--	--	0.90	--	--	4.88(5)
Ser	--	3.67(4)	--	1.12	--	0.89	--	8.11(8)
Glx	--	2.26	--	2.04	1.37	1.10	--	14.96(15)
Pro	--	--	1.12	--	0.89	--	--	5.18(5)
Gly	1.05	--	--	1.36	--	--	--	6.11(6)
Ala	3.69(4)	2.21	1.19	1.33	2.26	3.74(4)	--	17.82(18)
Cys	--	--	--	1.36	--	--	--	0.84(1)
Val	1.92	--	1.02	1.78(3)	--	1.62(2)	--	10.86(11)
Met	--	--	--	--	0.57(1)	--	--	2.66(3)
Ile	--	1.19	--	--	--	--	--	1.02(1)
Leu	1.03	5.17	--	3.80	--	2.30(2)	--	17.95(18)
Tyr	--	0.98	--	--	0.87	--	1.00	5.06(5)
Phe	--	--	0.91	1.05	0.87	1.24	--	8.20(8)
His	--	1.20	--	0.91	1.08	--	--	7.09(7)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	1.13	--	0.92	0.97	1.13	1.02	--	11.14(11)
Arg	--	1.14	--	--	--	--	1.00	4.03(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab. 2: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α -D-Ketten der Hämoglobine der Streifengans (*Anser indicus*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.89	--	--	2.13	--	1.09	--	--
Thr	--	--	--	--	2.13	0.94	--	--
Ser	0.89	--	--	--	--	0.91	0.89	--
Glx	--	--	1.89	4.22	1.20	2.33	--	--
Pro	--	--	--	--	0.99	2.00	--	--
Gly	--	--	--	2.04	--	1.17	0.87	--
Ala	0.89	--	1.24	2.07	--	--	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	0.95	1.11	1.91	--	--
Met	0.65(1)	--	--	--	0.66(1)	--	--	--
Ile	--	--	1.34(2)	--	--	--	--	--
Leu	0.98	--	1.06	0.98	--	--	--	--
Tyr	--	--	--	--	0.90	0.63	--	--
Phe	--	--	--	0.96	1.05	1.98	--	--
His	--	--	--	0.95	--	2.16	1.01	--
Trp	--	--	0.67(1)	--	--	--	--	--
Lys	1.01	1.00	1.22	--	1.04	--	1.01	1.00
Arg	--	--	--	0.99	--	0.88	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-115	Tp12b 116-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	0.93	4.33	2.13	--	1.77	--	--	14.20(14)
Thr	--	--	--	--	0.96	--	--	4.29(4)
Ser	--	3.80(4)	--	0.99	--	1.32	--	9.11(9)
Glx	--	2.25	--	1.76(2)	1.25	1.30	--	14.87(15)
Pro	--	--	0.85	--	1.10	--	--	5.16(5)
Gly	0.89	--	--	0.76	--	--	--	5.92(6)
Ala	4.27	2.11	1.01	1.17	1.87	3.84(4)	--	17.80(18)
Cys	--	--	--	0.99	--	--	--	0.86(1)
Val	1.94	--	1.00	1.80(3)	--	1.67(2)	--	11.90(12)
Met	--	--	--	--	0.76	--	--	2.77(3)
Ile	--	0.89	--	--	--	--	--	2.89(3)
Leu	0.97	5.16	--	3.69(4)	--	2.35(2)	--	14.98(15)
Tyr	--	0.83	--	--	0.79	--	1.00	5.11(5)
Phe	--	--	1.00	1.19	0.96	0.75	--	8.18(8)
His	--	0.97	--	0.72	1.29	--	--	7.10(7)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	0.92	--	1.01	1.09	0.96	0.78	--	11.10(11)
Arg	--	0.97	--	--	--	--	1.00	3.95(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab.3: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^A -Ketten der Hämoglobine der Andengans (*Chloephaga melanoptera*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.03	1.01	--	2.02	--	1.05	--	--
Thr	--	--	--	1.02	1.01	1.02	--	--
Ser	0.91	--	0.98	--	--	1.03	--	--
Glx	--	--	--	2.02	1.04	1.05	--	--
Pro	--	--	--	--	1.06	1.03	--	--
Gly	--	--	1.02	2.98	--	1.06	1.05	--
Ala	1.96	1.01	--	2.03	1.02	1.01	1.05	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.96	1.02	0.94	--	--	--	--	--
Met	--	--	--	--	0.88	--	--	--
Ile	--	--	--	0.95	1.02	0.99	--	--
Leu	1.03	--	--	0.98	--	1.03	--	--
Tyr	--	--	--	0.92	0.88	0.88	--	--
Phe	--	--	0.97	--	1.03	1.96	--	--
His	--	--	--	1.06	--	3.03	0.94	--
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.00	1.00	1.02	--	1.09	0.96	0.96	1.00
Arg	--	--	--	0.99	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-82	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	2.99	1.02	--	2.01	1.02	--	--	12.03(12)
Thr	0.99	--	--	--	1.06	0.99	--	6.04(6)
Ser	0.99	0.95	--	--	0.89	--	--	5.90(6)
Glx	1.09	1.02	--	--	1.09	--	--	7.02(7)
Pro	--	--	--	1.02	2.06	--	--	5.26(5)
Gly	0.98	--	--	--	1.06	1.04	--	9.22(9)
Ala	4.99	1.02	--	--	3.98	2.99	--	21.09(21)
Cys	--	--	--	--	0.94	0.93	--	1.55(2)
Val	2.79(3)	--	--	1.98	3.76(4)	1.96	--	14.21(14)
Met	--	--	--	--	--	0.89	--	1.73(2)
Ile	1.95	--	--	--	1.04	--	--	5.99(6)
Leu	1.95	2.04	1.00	--	3.80(4)	0.98	--	12.88(13)
Tyr	--	--	--	--	--	--	1.00	3.94(4)
Phe	--	--	--	1.02	1.98	0.97	--	6.92(7)
His	1.08	0.91	--	--	3.81(4)	--	--	10.64(11)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.05	1.00	--	1.03	1.00	1.00	--	11.96(12)
Arg	--	--	1.00	--	--	--	1.00	3.04(3)
Summe	21	8	2	7	28	12	2	141

Tab. 4: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α -Ketten der Hämoglobine der Andengans (Chloephaga melanoptera). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.96	--	--	--	--	1.05	--	--
Thr	1.02	--	0.98	--	2.04	1.02	--	--
Ser	--	--	--	0.96	--	1.03	--	--
Glx	--	--	2.04	5.06	0.97	1.05	--	--
Pro	--	--	--	--	1.01	1.03	--	--
Gly	--	--	--	1.98	--	1.06	2.01	--
Ala	0.99	--	--	1.98	--	1.01	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	1.04	--	--	--	--
Met	0.96	--	--	--	0.86	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	0.99	--	--
Leu	1.00	--	3.01	0.99	0.98	1.03	--	--
Tyr	--	--	--	--	0.99	0.88	--	--
Phe	--	--	--	0.99	1.01	1.96	--	--
His	--	--	--	0.94	--	3.03	1.02	--
Trp	--	--	0.99	--	--	--	--	--
Lys	1.00	1.00	0.98	--	1.04	0.98	1.01	1.00
Arg	--	--	--	0.96	--	--	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-115	Tp 12b 116-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	1.06	4.05	2.02	--	2.09	--	--	12.08(12)
Thr	--	--	--	0.96	--	--	--	6.04(6)
Ser	--	3.95	--	--	0.97	0.99	--	7.77(8)
Glx	--	2.07	--	2.08	0.97	1.05	--	15.10(16)
Pro	--	--	1.01	--	1.02	--	--	5.02(5)
Gly	1.04	--	--	1.04	--	--	--	7.15(7)
Ala	4.06	2.03	1.02	2.03	1.98	4.02	--	18.19(18)
Cys	--	--	--	0.91	--	--	--	0.89(1)
Val	1.96	--	0.98	1.89	--	2.03	--	8.89(9)
Met	--	--	--	--	0.90	--	--	2.89(3)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.03	5.76(6)	--	3.67(4)	--	1.96	--	19.79(20)
Tyr	--	0.96	--	--	0.96	--	1.00	5.09(5)
Phe	--	--	1.00	1.03	0.98	1.04	--	8.06(8)
His	--	0.95	--	0.89	1.02	--	--	6.92(7)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	1.02	1.00	1.00	1.01	1.01	1.00	--	11.04(11)
Arg	--	--	--	--	--	--	1.00	4.03(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab.5: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der β -Ketten der Hämoglobine der Andengans (Chloephaga melanoptera). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5/6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b
Pos.	1-8	9-17	18-30	31-40	41-61	62-65	66	67-76	77-82
Asx	--	--	2.06	--	2.01	--	--	0.98	3.02
Thr	0.94	0.97	--	0.96	1.04	--	--	1.01	--
Ser	--	--	--	--	3.97	--	--	0.88	--
Glx	2.02	1.03	1.10	1.05	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	1.05	2.02	--	--	--	--
Gly	--	2.04	0.98	--	2.03	0.99	--	1.06	--
Ala	1.04	--	3.99	--	1.98	0.96	--	1.03	--
Cys	--	--	0.84	--	--	--	--	--	--
Val	1.02	--	1.96	0.98	0.96	--	--	1.95	--
Met	--	--	--	--	0.85	--	--	--	--
Ile	--	1.02	--	1.04	1.04	--	--	--	0.98
Leu	--	2.04	1.01	2.05	0.96	--	--	1.07	1.03
Tyr	--	--	--	0.93	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.97	--	--	0.96	--
His	--	--	--	--	--	0.87	--	--	--
Trp	0.86	0.86	--	0.88	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.01	--	--	--	0.96	1.00	0.95	1.02
Arg	--	--	0.99	0.99	0.96	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6

	Tp10	Tp11	Tp12	Tp13	Tp14a	Tp14b	Tp14c	Tp15	Ketten-
Pos	83-95	96-104	105-120	121-132	133-135	136-143	145	145-146	analyse
Asx	1.99	2.03	1.03	2.01	--	--	--	--	14.89(15)
Thr	0.96	--	0.98	0.96	--	--	--	--	7.86(8)
Ser	1.94	--	--	--	--	--	--	--	6.85(7)
Glx	2.04	1.04	--	2.08	--	--	--	--	10.12(10)
Pro	--	0.97	--	0.96	--	--	--	--	4.95(5)
Gly	--	--	1.04	--	--	--	--	--	8.21(8)
Ala	--	--	2.03	2.08	--	2.99	--	--	16.18(16)
Cys	0.85	--	--	0.92	--	--	--	--	2.79(3)
Val	--	1.01	0.99	--	1.00	2.04	--	--	11.89(12)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	0.89(1)
Ile	--	--	3.06	--	--	--	--	--	6.89(7)
Leu	1.99	1.04	3.93	--	1.02	1.01	--	--	16.85(17)
Tyr	--	--	--	--	--	--	--	1.00	1.89(2)
Phe	0.99	1.00	1.01	0.98	--	--	--	--	8.01(8)
His	0.96	1.02	0.89	--	--	0.96	--	1.00	5.87(6)
Trp	--	--	--	0.89	--	--	--	--	3.81(4)
Lys	1.04	--	1.02	1.01	--	--	1.00	--	9.89(10)
Arg	--	0.98	--	--	1.00	1.01	--	--	6.02(6)
Summe	13	9	16	12	3	8	1	2	146

Tab.6: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α -Ketten der Hämoglobine des Habichts (*Accipiter gentilis*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.97	1.01	1.03	--	--	1.05	--	--
Thr	--	1.02	1.06	1.02	3.01	1.01	--	--
Ser	0.91	--	--	--	--	1.03	--	--
Glx	--	--	--	4.02	--	1.06	--	--
Pro	--	--	--	--	1.96	1.03	--	--
Gly	--	--	--	2.99	--	1.05	1.06	--
Ala	0.96	--	--	2.03	--	1.02	1.05	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.95	1.02	0.94	--	--	--	--	--
Met	--	--	--	--	0.85	--	--	--
Ile	--	--	--	0.94	--	0.99	--	--
Leu	1.01	--	--	1.02	--	1.03	--	--
Tyr	--	--	--	0.89	0.87	0.89	--	--
Phe	--	--	0.96	--	1.04	1.95	--	--
His	--	--	--	1.06	--	3.04	0.94	--
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.00	1.00	1.01	--	1.09	0.96	0.96	1.00
Arg	--	--	--	0.99	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-82	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	3.02	1.03	--	2.00	1.02	1.08	--	13.03(13)
Thr	--	--	--	--	1.00	0.99	--	9.03(9)
Ser	1.04	0.96	--	--	1.89	--	--	5.84(6)
Glx	1.09	1.00	--	--	2.09	--	--	8.92(9)
Pro	--	--	--	1.02	2.04	--	--	6.26(6)
Gly	1.98	--	--	--	1.06	1.03	--	9.22(9)
Ala	3.99	1.00	--	--	1.98	1.99	--	13.99(14)
Cys	--	--	--	--	1.01	0.95	--	1.56(2)
Val	2.69(3)	--	--	1.96	4.78(5)	1.98	--	15.21(15)
Met	--	--	--	--	--	--	--	0.71(1)
Ile	2.93	--	--	--	1.03	--	--	5.99(6)
Leu	1.95	2.00	1.00	--	4.83(5)	1.98	--	14.89(15)
Tyr	--	--	--	--	--	--	1.00	3.94(4)
Phe	--	--	--	1.00	0.98	0.97	--	6.92(7)
His	1.08	0.92	--	--	2.80(3)	--	--	10.11(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.05	1.00	--	1.03	1.00	1.00	--	11.99(12)
Arg	--	--	1.00	--	--	--	1.00	3.05(3)
Summe	21	8	2	7	28	12	2	141

Tab. 7: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^D -Ketten der Hämoglobine der Habichts (*Accipiter gentilis*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	0.96	--	1.05	0.96	--	2.03	--	--
Thr	1.00	--	--	--	3.04	0.98	--	--
Ser	--	--	--	--	--	2.06	1.01	--
Glx	1.02	--	1.04	5.06	--	1.08	--	--
Pro	--	--	--	--	1.01	1.87	--	--
Gly	--	--	--	1.98	--	1.08	1.02	--
Ala	0.99	--	1.02	1.98	--	--	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	0.96	--	0.99	--	--
Met	0.98	--	--	--	0.88	--	--	--
Ile	--	--	1.96	--	1.01	--	--	--
Leu	1.00	--	1.00	0.99	--	1.09	--	--
Tyr	--	--	--	--	0.99	0.97	--	--
Phe	--	--	--	0.99	1.01	2.04	--	--
His	--	--	--	0.94	--	1.01	1.01	--
Trp	--	--	1.00	--	--	--	--	--
Lys	1.00	1.00	0.98	--	1.04	--	1.01	1.00
Arg	--	--	--	0.96	--	0.98	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-115	Tp12b 116-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	2.06	4.09	2.03	--	1.09	--	--	14.08(14)
Thr	--	--	--	--	0.93	--	--	5.74(6)
Ser	--	3.96	--	0.96	0.97	0.99	--	9.77(10)
Glx	--	2.09	--	2.08	2.00	1.05	--	15.10(15)
Pro	--	--	1.00	--	1.02	--	--	5.02(5)
Gly	1.02	--	--	1.04	--	--	--	6.11(6)
Ala	2.06	2.01	--	1.03	1.00	4.01	--	13.99(14)
Cys	--	--	--	0.91	--	--	--	0.89(1)
Val	2.98	--	1.98	2.89	1.04	2.06	--	12.89(13)
Met	--	0.89	--	--	--	--	--	2.89(3)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	3.11(3)
Leu	1.00	4.76(5)	--	3.67(4)	--	2.01	--	15.99(16)
Tyr	--	0.86	--	--	0.96	--	1.00	5.01(5)
Phe	--	--	1.00	1.03	0.98	1.00	--	8.06(8)
His	--	1.02	--	0.89	1.02	--	--	5.92(6)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	1.02	--	1.00	1.01	1.01	1.00	--	11.01(11)
Arg	--	1.00	--	--	--	--	1.00	4.02(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab.8: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der β -Ketten der Hämoglobine des Habichts (*Accipiter gentilis*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5/6 41-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82
Asx	--	--	2.07	--	2.01	--	--	--	3.02
Thr	--	0.96	--	0.95	1.03	--	--	1.00	--
Ser	--	--	--	--	2.99	--	--	0.89	--
Glx	3.02	1.02	1.10	1.04	--	--	--	1.04	--
Pro	--	--	--	1.04	1.01	--	--	--	--
Gly	--	2.04	0.99	--	2.03	0.99	--	1.04	--
Ala	2.04	--	3.99	--	2.99	0.95	--	1.03	--
Cys	--	--	0.84	--	--	--	--	--	--
Val	1.01	--	1.95	1.01	1.99	--	--	1.96	--
Met	--	--	--	--	0.86	--	--	--	--
Ile	--	1.01	--	1.04	--	--	--	--	0.98
Leu	--	2.01	1.00	2.04	2.05	--	--	1.08	1.02
Tyr	--	--	--	0.94	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.99	--	--	0.95	--
His	--	--	--	--	--	0.87	--	--	--
Trp	0.86	0.86	--	0.88	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.00	--	--	--	0.96	1.00	0.95	1.02
Arg	--	--	0.99	0.99	0.96	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6

Pos	Tp10 83-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14a 133-135	Tp14b 136-143	Tp14c 145	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	1.99	2.04	1.03	2.01	--	--	--	--	13.99(14)
Thr	1.09	--	--	--	--	--	--	--	4.87(5)
Ser	0.94	--	--	1.04	--	--	--	--	5.87(6)
Glx	2.07	1.04	--	2.08	--	--	--	--	12.10(12)
Pro	--	0.98	--	0.96	--	--	--	--	3.96(4)
Gly	--	--	2.02	--	--	--	--	--	9.11(9)
Ala	1.01	--	2.01	2.11	--	3.99	--	--	20.20(20)
Cys	0.86	--	--	0.92	--	--	--	--	2.79(3)
Val	--	1.00	1.99	--	1.01	1.04	--	--	13.01(13)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	0.99(1)
Ile	--	--	1.99	--	--	--	--	--	4.88(5)
Leu	1.99	1.09	4.01	--	1.02	1.01	--	--	17.86(18)
Tyr	--	--	--	--	--	--	--	1.00	1.99(2)
Phe	0.99	1.00	1.01	0.93	--	--	--	--	8.01(8)
His	0.99	1.04	0.89	--	--	0.96	--	1.00	5.89(6)
Trp	--	--	--	0.89	--	--	--	--	4.01(4)
Lys	1.04	--	1.03	1.00	--	--	1.00	--	9.99(10)
Arg	--	0.98	--	--	1.00	1.00	--	--	6.01(6)
Summe	13	9	16	12	3	8	1	2	146

Tab.9: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^A -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers (*Gyps rueppellii*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	2.01	1.04	1.04	1.02	--	1.08	--	--
Thr	--	0.93	1.07	1.99	3.02	1.01	--	--
Ser	0.92	--	--	--	--	0.98	--	--
Glx	--	--	--	3.08	--	1.07	--	--
Pro	--	--	--	--	1.94	0.88	--	--
Gly	--	--	--	1.99	--	0.99	1.13	--
Ala	0.96	--	--	2.09	--	1.06	1.06	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	1.01	0.97	0.94	--	--	--	--	--
Met	--	--	--	--	0.84	--	--	--
Ile	--	--	--	0.93	--	0.99	--	--
Leu	1.04	--	--	0.97	--	1.13	--	--
Tyr	--	--	--	0.88	0.87	0.82	--	--
Phe	--	--	0.91	--	1.07	1.96	--	--
His	--	--	--	1.06	--	3.04	0.94	--
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	0.98	0.96	1.02	--	1.06	0.97	0.96	1.00
Arg	--	--	--	0.96	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-82	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	3.08	1.03	--	2.20	1.02	1.09	--	14.03(14)
Thr	--	--	--	--	1.08	0.99	--	9.96(10)
Ser	0.94	0.85	--	--	1.95	--	--	5.86(6)
Glx	1.07	1.00	--	--	2.09	--	--	7.96(8)
Pro	--	--	--	0.98	1.99	--	--	6.16(6)
Gly	2.09	--	--	--	1.03	1.13	--	7.94(8)
Ala	4.08	0.97	--	--	2.09	1.89	--	13.99(14)
Cys	--	--	--	--	1.00	0.95	--	1.67(2)
Val	2.79(3)	--	--	1.77	4.79(5)	1.65(2)	--	15.11(15)
Met	--	--	--	--	--	--	--	0.61(1)
Ile	2.91	--	--	--	1.01	--	--	6.01(6)
Leu	2.14	2.16	1.00	--	4.77(5)	1.96	--	14.89(15)
Tyr	--	--	--	--	--	--	1.00	3.97(4)
Phe	--	--	--	1.00	1.01	0.91	--	6.91(7)
His	1.05	0.95	--	--	2.79(3)	--	--	10.10(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.05	1.00	--	1.03	1.01	1.00	--	11.89(12)
Arg	--	--	1.00	--	--	--	1.00	3.16(3)
Summe	21	8	2	7	28	12	2	141

Tab. 10: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^1 -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers (Gyps rueppellii). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	2.01	1.04	1.04	1.02	--	1.08	--	--
Thr	--	0.93	1.07	1.99	2.02	1.01	--	--
Ser	0.92	--	--	--	--	0.98	--	--
Glx	--	--	--	3.08	--	1.07	--	--
Pro	--	--	--	--	1.94	0.88	--	--
Gly	--	--	--	1.99	--	0.99	1.13	--
Ala	0.96	--	--	2.09	--	1.06	1.06	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	1.01	0.97	0.94	--	--	--	--	--
Met	--	--	--	--	0.84	--	--	--
Ile	--	--	--	0.93	1.02	0.99	--	--
Leu	1.14	--	--	0.97	--	1.13	--	--
Tyr	--	--	--	0.88	0.87	0.82	--	--
Phe	--	--	0.91	--	1.17	1.96	--	--
His	--	--	--	1.06	--	3.04	0.94	--
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	0.98	0.96	1.02	--	1.06	0.97	0.96	1.00
Arg	--	--	--	0.96	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-82	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	3.08	1.03	--	2.20	1.02	1.09	--	14.03(14)
Thr	--	--	--	--	1.08	0.99	--	8.86(9)
Ser	0.94	0.85	--	--	1.95	--	--	5.86(6)
Glx	1.07	1.00	--	--	2.09	--	--	7.96(8)
Pro	--	--	--	0.98	1.99	--	--	6.16(6)
Gly	2.09	--	--	--	1.03	1.13	--	7.94(8)
Ala	4.08	0.97	--	--	2.09	1.89	--	13.99(14)
Cys	--	--	--	--	1.00	0.95	--	1.67(2)
Val	2.79(3)	--	--	1.77	4.79(5)	1.65(2)	--	15.11(15)
Met	--	--	--	--	--	--	--	0.61(1)
Ile	2.91	--	--	--	1.01	--	--	7.01(7)
Leu	2.14	2.16	1.00	--	4.77(5)	1.96	--	14.89(15)
Tyr	--	--	--	--	--	--	1.00	3.97(4)
Phe	--	--	--	1.00	1.01	0.91	--	6.91(7)
His	1.05	0.95	--	--	2.79(3)	--	--	10.10(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.05	1.10	--	1.03	1.01	1.00	--	11.89(12)
Arg	--	--	1.00	--	--	--	1.00	3.16(3)
Summe	21	8	2	7	28	12	2	141

Tab. 11: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^D -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers (*Gyps rueppellii*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.95	--	1.02	0.92	--	2.00	--	--
Thr	1.10	--	2.04	--	2.05	0.98	--	--
Ser	--	--	--	--	--	2.00	--	--
Glx	--	--	1.16	5.10	1.02	1.04	--	--
Pro	--	--	--	--	1.01	1.86	--	--
Gly	--	--	--	1.98	--	1.04	2.01	--
Ala	0.99	--	--	1.97	--	--	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	0.95	--	1.00	--	--
Met	0.98	--	--	--	0.89	--	--	--
Ile	--	--	0.94	--	1.10	--	--	--
Leu	1.10	--	1.00	0.99	--	1.01	--	--
Tyr	--	--	--	--	0.89	0.82	--	--
Phe	--	--	--	0.99	1.00	2.04	--	--
His	--	--	--	0.95	--	1.01	0.89	--
Trp	--	--	1.00	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.00	0.95	--	1.04	--	1.01	1.00
Arg	--	--	--	0.95	--	0.95	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-115	Tp12b 116-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	2.08	4.10	2.05	--	1.00	--	--	15.08(15)
Thr	--	--	--	--	0.94	--	--	6.74(7)
Ser	--	3.86(4)	--	1.06	0.87	1.02	--	8.77(9)
Glx	--	2.19	--	2.20	2.09	1.03	--	15.10(15)
Pro	--	--	1.00	--	1.04	--	--	5.02(5)
Gly	1.12	--	--	0.96	--	--	--	7.11(7)
Ala	2.08	1.94	--	1.02	1.02	3.96	--	12.99(13)
Cys	--	--	--	0.69	--	--	--	0.89(1)
Val	2.97	--	1.97	3.10	1.14	1.98	--	12.89(13)
Met	--	0.89	--	--	--	--	--	2.89(3)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	2.11(2)
Leu	1.06	4.66(5)	--	3.79(4)	--	2.01	--	15.99(16)
Tyr	--	0.84	--	--	0.66(1)	--	1.00	5.01(5)
Phe	--	--	1.00	1.02	0.98	0.99	--	8.06(8)
His	--	1.02	--	0.92	1.04	--	--	5.92(6)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	1.02	--	1.00	1.04	1.04	0.96	--	11.01(11)
Arg	--	1.00	--	--	--	--	1.00	4.02(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab. 12: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α^D -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers (Gyps rueppellii). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.95	--	1.02	0.92	--	2.00	--	--
Thr	1.10	--	2.04	--	2.05	0.98	--	--
Ser	--	--	--	--	--	2.00	--	--
Glx	--	--	1.16	5.10	1.02	1.04	--	--
Pro	--	--	--	--	1.01	1.86	--	--
Gly	--	--	--	1.98	--	1.04	2.01	--
Ala	0.99	--	--	1.97	--	--	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	0.95	--	1.00	--	--
Met	0.98	--	--	--	0.89	--	--	--
Ile	--	--	0.94	--	1.10	--	--	--
Leu	1.10	--	1.00	0.99	--	1.01	--	--
Tyr	--	--	--	--	0.89	0.82	--	--
Phe	--	--	--	0.99	1.00	2.04	--	--
His	--	--	--	0.95	--	1.01	0.89	--
Trp	--	--	1.00	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.00	0.95	--	1.04	--	1.01	1.00
Arg	--	--	--	0.95	--	0.95	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-115	Tp12b 116-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	2.08	4.10	2.05	1.01	1.00	--	--	16.08(16)
Thr	--	--	--	--	0.94	--	--	6.74(7)
Ser	--	3.86(4)	--	1.06	0.87	1.02	--	8.77(9)
Glx	--	2.19	--	2.20	2.09	1.03	--	15.10(15)
Pro	--	--	1.00	--	1.04	--	--	5.02(5)
Gly	1.12	--	--	0.96	--	--	--	7.11(7)
Ala	2.08	1.94	--	1.02	1.02	3.96	--	12.99(13)
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	2.97	--	1.97	3.10	1.14	1.98	--	12.89(13)
Met	--	0.89	--	--	--	--	--	2.89(3)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	2.11(2)
Leu	1.06	4.66(5)	--	3.79(4)	--	2.01	--	15.99(16)
Tyr	--	0.84	--	--	0.66(1)	--	1.00	5.01(5)
Phe	--	--	1.00	1.02	0.98	0.99	--	8.06(8)
His	--	1.02	--	0.92	1.04	--	--	5.92(6)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	1.02	--	1.00	1.04	1.04	0.96	--	11.01(11)
Arg	--	1.00	--	--	--	--	1.00	4.02(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab.13: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der β -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers (*Gyps rueppellii*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5/6 41-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82
Asx	--	--	2.09	--	2.01	--	--	--	3.02
Thr	0.98	0.96	--	0.96	1.02	--	--	1.00	--
Ser	--	--	--	--	3.02	--	--	0.89	--
Glx	2.03	1.03	1.10	1.04	--	--	--	1.05	--
Pro	--	--	--	1.01	2.01	--	--	--	--
Gly	--	2.04	0.99	--	2.01	0.99	--	1.02	--
Ala	1.06	--	3.99	--	2.04	0.96	--	1.03	--
Cys	--	--	0.83	--	--	--	--	--	--
Val	1.01	--	1.96	1.01	1.01	--	--	1.96	--
Met	--	--	--	--	0.86	--	--	--	--
Ile	--	1.01	--	1.04	2.01	--	--	--	0.97
Leu	--	2.01	1.00	2.02	1.05	--	--	1.08	1.03
Tyr	--	--	--	0.94	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.99	--	--	0.95	--
His	0.98	--	--	--	--	0.86	--	--	--
Trp	0.86	0.86	--	0.89	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.00	--	--	--	0.96	1.00	0.95	1.02
Arg	--	--	0.99	0.99	0.96	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6

Pos	Tp10 83-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14a 133-135	Tp14b 136-143	Tp14c 145	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	1.99	2.08	1.02	2.01	--	--	--	--	13.99(14)
Thr	1.19	--	--	--	--	--	--	--	5.87(6)
Ser	0.94	--	--	1.04	--	--	--	--	5.87(6)
Glx	2.07	1.06	--	2.09	--	--	--	--	11.10(11)
Pro	--	0.98	--	0.95	--	--	--	--	4.96(5)
Gly	--	--	2.03	--	--	--	--	--	9.11(9)
Ala	1.01	--	2.01	2.11	--	3.99	--	--	18.20(18)
Cys	0.85	--	--	0.92	--	--	--	--	2.79(3)
Val	--	1.00	0.99	--	1.01	1.04	--	--	11.01(11)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	0.99(1)
Ile	--	--	2.99	--	--	--	--	--	7.88(8)
Leu	1.99	1.09	4.01	--	1.02	1.01	--	--	16.86(17)
Tyr	--	--	--	--	--	--	--	1.00	1.99(2)
Phe	0.99	1.00	1.01	0.91	--	--	--	--	8.01(8)
His	0.89	1.04	0.89	--	--	0.96	--	1.00	6.89(7)
Trp	--	--	--	0.89	--	--	--	--	4.01(4)
Lys	1.05	--	1.03	1.00	--	--	1.00	--	9.99(10)
Arg	--	0.98	--	--	1.00	1.00	--	--	6.01(6)
Summe	13	9	16	12	3	8	1	2	146

Tab. 14: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α -Ketten der Hämoglobine des Wollkopfgeiers (*Trigonoceps occipitalis*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.98	1.06	--	1.01	--	1.05	--	--
Thr	--	1.09	2.07	2.01	2.06	1.05	--	--
Ser	0.96	--	--	--	--	0.99	--	--
Glx	--	--	--	3.04	--	1.01	--	--
Pro	--	--	--	--	1.95	0.97	--	--
Gly	--	--	--	1.99	--	1.09	1.01	--
Ala	0.96	--	--	2.04	--	1.04	0.99	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	1.03	0.91	0.98	--	--	--	--	--
Met	--	--	--	--	0.88	--	--	--
Ile	--	--	--	0.91	0.98	0.97	--	--
Leu	1.04	--	--	0.97	--	1.07	--	--
Tyr	--	--	--	0.88	0.85	0.86	--	--
Phe	--	--	0.98	--	0.94	1.96	--	--
His	--	--	--	0.99	--	3.09	1.01	--
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	0.98	0.98	1.01	--	1.03	0.96	0.99	1.00
Arg	--	--	--	0.94	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-82	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	3.04	1.13	--	2.06	1.04	1.04	--	13.11(13)
Thr	--	--	--	--	1.05	--	--	8.65(9)
Ser	0.96	0.95	--	--	1.90	1.01	--	6.69(7)
Glx	1.02	1.03	--	--	2.07	--	--	7.86(8)
Pro	--	--	--	0.98	1.99	--	--	6.16(6)
Gly	2.09	--	--	--	1.06	1.05	--	8.06(8)
Ala	4.08	0.91	--	--	2.09	1.89	--	13.97(14)
Cys	--	--	--	--	0.89	1.02	--	1.66(2)
Val	2.89(3)	--	--	1.97	4.79(5)	1.77(2)	--	15.13(15)
Met	--	--	--	--	--	--	--	0.71(1)
Ile	2.91	--	--	--	1.01	--	--	7.03(7)
Leu	2.08	2.15	1.00	--	4.89	1.89	--	14.89(15)
Tyr	--	--	--	--	--	--	1.00	3.88(4)
Phe	--	--	--	1.03	1.01	0.93	--	6.91(7)
His	1.04	0.88	--	--	2.98	--	--	10.09(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Lys	1.03	1.00	--	1.03	1.01	1.00	--	11.98(12)
Arg	--	--	1.00	--	--	--	1.00	3.04(3)
Summe	21	8	2	7	28	12	2	141

Tab.15: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der α -Ketten der Hämoglobine des Wollkopfgeiers (*Trigonoceps occipitalis*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2a 8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.95	--	1.04	0.95	--	2.03	--	--
Thr	1.01	--	1.04	--	2.04	1.00	--	--
Ser	--	--	--	--	--	2.00	--	--
Glx	--	--	1.08	5.01	--	1.05	--	--
Pro	--	--	--	--	2.03	1.95	--	--
Gly	--	--	--	1.98	--	1.04	2.03	--
Ala	0.98	--	1.03	1.98	--	--	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	--	--	0.94	--	1.00	--	--
Met	0.98	--	--	--	0.87	--	--	--
Ile	--	--	0.97	--	1.11	--	--	--
Leu	1.11	--	1.04	0.97	--	1.00	--	--
Tyr	--	--	--	--	0.89	0.87	--	--
Phe	--	--	--	0.99	1.01	2.02	--	--
His	--	--	--	0.97	--	1.06	0.88	--
Trp	--	--	1.00	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.00	0.95	--	1.04	--	1.02	1.00
Arg	--	--	--	0.95	--	0.96	--	--
Summe	7	1	8	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9a 62-71	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12a 100-115	Tp12b 116-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	2.08	4.10	2.03	--	1.01	--	--	15.08(15)
Thr	--	--	--	--	0.96	--	--	5.86(6)
Ser	--	3.96	--	1.03	--	1.03	--	7.86(8)
Glx	--	2.11	--	2.01	2.08	1.01	--	14.13(14)
Pro	--	--	1.00	--	1.04	--	--	6.07(6)
Gly	1.04	--	--	0.97	--	--	--	7.15(7)
Ala	2.08	1.95	--	1.02	2.04	3.98	--	14.97(15)
Cys	--	--	--	0.69	--	--	--	0.89(1)
Val	2.97	--	1.99	3.11	1.06	1.99	--	12.89(13)
Met	--	0.89	--	--	--	--	--	2.88(3)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	2.01(2)
Leu	1.04	4.68(5)	--	3.89	--	2.01	--	15.89(16)
Tyr	--	0.84	--	--	0.68(1)	--	1.00	5.08(5)
Phe	--	--	1.00	1.03	0.98	0.99	--	8.09(8)
His	--	1.04	--	0.93	1.04	--	--	5.85(6)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	1.00(1)
Lys	1.02	--	1.00	1.01	1.03	0.95	--	11.03(11)
Arg	--	1.00	--	--	--	--	1.00	4.03(4)
Summe	10	21	7	16	12	12	2	141

Tab. 16: Analysen der tryptischen Peptide und des Globins der β -Ketten der Hämoglobine des Wollkopfsgeiers (*Trigonoceps occipitalis*). Die Werte in Klammern sind der Sequenzanalyse entnommen.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5/6 41-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82
Asx	--	--	2.08	--	2.03	--	--	--	2.99
Thr	0.98	0.98	--	0.97	1.03	--	--	1.03	--
Ser	--	--	--	--	3.03	--	--	0.97	--
Glx	2.04	1.11	1.01	1.04	--	--	--	1.05	--
Pro	--	--	--	1.01	2.04	--	--	--	--
Gly	--	2.04	0.99	--	2.04	0.99	--	1.01	--
Ala	1.07	--	3.98	--	2.05	0.99	--	1.03	--
Cys	--	--	0.86	--	--	--	--	--	--
Val	1.03	--	2.06	1.01	1.01	--	--	1.96	--
Met	--	--	--	--	0.95	--	--	--	--
Ile	--	1.02	--	1.05	2.04	--	--	--	0.97
Leu	--	2.04	0.99	2.04	1.06	--	--	1.07	1.04
Tyr	--	--	--	0.93	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.99	--	--	0.96	--
His	0.87	--	--	--	--	0.96	--	--	--
Trp	0.87	0.89	--	0.99	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.01	--	--	--	0.96	1.00	0.96	1.03
Arg	--	--	0.99	0.99	0.96	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6

Pos	Tp10 83-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14a 133-135	Tp14b 136-143	Tp14c 145	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	2.04	2.03	1.02	2.03	--	--	--	--	13.96(14)
Thr	1.08	--	--	--	--	--	--	--	5.92(6)
Ser	0.92	--	--	1.05	--	--	--	--	5.93(6)
Glx	2.07	1.06	--	2.08	--	--	--	--	11.09(11)
Pro	--	0.97	--	0.94	--	--	--	--	4.87(5)
Gly	--	--	2.06	--	--	--	--	--	9.01(9)
Ala	1.01	--	2.03	2.10	--	3.99	--	--	18.25(18)
Cys	0.87	--	--	0.92	--	--	--	--	2.88(3)
Val	--	1.01	0.98	--	1.00	1.04	--	--	11.05(11)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	0.99(1)
Ile	--	--	2.96	--	--	--	--	--	8.07(8)
Leu	2.09	1.08	4.03	--	1.01	1.03	--	--	16.84(17)
Tyr	--	--	--	--	--	--	1.00	--	2.06(2)
Phe	0.98	1.01	0.99	0.92	--	--	--	--	8.07(8)
His	0.88	1.02	0.89	--	--	0.97	--	1.00	6.88(7)
Trp	--	--	--	0.89	--	--	--	--	4.05(4)
Lys	1.05	--	1.04	1.01	--	--	1.00	--	9.08(10)
Arg	--	0.99	--	--	1.00	1.01	--	--	6.09(6)
Summe	13	9	16	12	3	8	1	2	146

Abb. 22: Sequenzen der α^D -Ketten aus Hb D der Andengans (AG), der Graugans (GG) und der Streifengans (STG). Von den $\alpha^{D'}$ -Ketten der Grau- und Streifengans sind N-terminal 42 Reste sequenziert. Die α^D - und $\alpha^{D'}$ -Ketten der Streifengans sind in diesem Bereich identisch.

	NA	A	AB B	
STG α^D		Ser	Ile-Ile-Ala	Asp
GG α^D			Ile Ala	Asp
GG $\alpha^{D'}$			Ile 10 Ala	20 Asp
AG α^D			Met-Leu-Thr-Ala-Asp-Asp-Lys-Lys-Leu-Leu-Thr-Gln-Leu-Trp-Glu-Lys-Val-Ala-Gly-His-Gln-Glu-Phe-Gly-	
			C	CD
STG α^D			Val	Val
GG α^D			Val	
GG $\alpha^{D'}$			Val	
AG α^D			-Ser-Glu-Ala-Leu-Gln-Arg-Met-Phe-Leu-Thr-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-His-Pro-	50
			E	EF
STG α^D		Ser		
GG α^D		Ser		
AG α^D			-Gly-Ser-Glu-Gln-Val-Arg-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Leu-Gly-Asn-Ala-Val-Lys-Ser-Leu-Asn-	70
			F	G
STG α^D		Ile		
GG α^D		Ile		
AG α^D		-Leu-Ser-Gln-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Asn-Leu-His-Ala-Tyr-Asn-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Lys-Leu-	90	100
			GH	
STG α^D		Ser	Val	H
GG α^D		Ser	110 Val	Thr
AG α^D			-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Gln-Val-Val-Leu-Ala-Thr-His-Leu-Gly-Lys-Asp-Tyr-Ser-Pro-Glu-Met-His-Ala-Ala-Phe-	120
			HC	
STG α^D				
GG α^D				
AG α^D			Asp-Lys-Phe-Leu-Ser-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Glu-Lys-Tyr Arg	130 140

Abb.24: Sequenzen der α ^D-Ketten aus Hb D des Habichts (HA) im Vergleich zu den entsprechenden Ketten der Hämoglobine des Mönchsgeiers (MG) (37)

HA	A	10	20	AB	B
MG αD	Asp	Thr			
HA αD	Met-Leu-Thr-Ala-Glu-Asp-Lys-Lys-Leu-Ile-Gln-Ala-Ile-Trp-Asp-Lys-Val-Gln-Gly-His-Gln-Glu-Asp-Phe-Gly-				
		C	CD		
MG αD	30	40	50		
HA αD	-Ala-Glu-Ala-Leu-Gln-Arg-Met-Phe-Ile-Thr-Tyr-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-Pro-				
	E		EF		
MG αD	Gly	60	70		
HA αD	-Gly-Ser-Asp-Gln-Val-Arg-Ser-His-Gly-Lys-Lys-Val-Val-Asn-Ala-Leu-Gly-Asn-Ala-Val-Lys-Ser-Met-Asp-Asn-				
	F	FG	G		
MG αD	80	90	100		
HA αD	-Leu-Ser-Gln-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Asn-Leu-His-Ala-Tyr-Asn-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-				
		GH	H		
MG αD	110	120	Ala		
HA αD	-Leu-Ser-Gln-Cys-Phe-Gln-Val-Val-Leu-Ala-Val-His-Leu-Gly-Lys-Glu-Tyr-Thr-Pro-Glu-Val-His-Ser-Ala-Phe-				
		HC			
MG αD	130	140			
HA αD	-Asp-Lys-Phe-Leu-Ser-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Glu-Lys-Tyr-Arg				

Abb. 26: Sequenzen der α^D - und $\alpha^{D'}$ -Ketten aus Hb D und Hb D' des Sperbergeiers (SG) im Vergleich zu den entsprechenden Ketten der Hämoglobine des Mönchsgeiers (MG) (37) und des Wollkopfsgeiers (WG)

WG α^D	NA	A	AB 8	
MG α^D			Ala	
SG α^D			Ala	
SG α^D			10	20
			Met-Leu-Thr-Ala-Asp-Asp-Lys-Lys-Leu-Ile-Gln-Thr-Thr-Trp-Asp-Lys-Val-Gln-Gly-His-Gln-Glu-Asp-Phe-Gly-	
			C	CD
WG α^D			Pro	
MG α^D			Pro	
SG α^D			30	40
SG α^D			-Ala-Glu-Ala-Leu-Gln-Arg-Net-Phe-Ile-Thr-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-Pro-	50
			E	EF
WG α^D			60	70
MG α^D			-Gly-Ser-Asp-Gln-Val-Arg-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Val-Asn-Ala-Leu-Gly-Asn-Ala-Val-Lys-Ser-Met-Asp-Asn-	
SG α^D			F	FG
SG α^D			80	90
SG α^D			-Leu-Ser-Gln-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Asn-Leu-His-Ala-Tyr-Asn-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-	100
			G	
WG α^D			GH	H
MG α^D			110	120
SG α^D			Asn	Ala
SG α^D			-Leu-Ser-Gln-Cys-Phe-Gln-Val-Val-Leu-Ala-Val-His-Leu-Gly-Lys-Glu-Tyr-Thr-Pro-Glu-Val-His-Ser-Ala-Phe-	Ala
			HC	
WG α^D			130	140
MG α^D			-Asp-Lys-Phe-Leu-Ser-Ala-Val-Ala-Val-Leu-Ala-Glu-Lys-Tyr-Arg	
SG α^D				

Abb. 28: Sequenzen der α - und β -Ketten aus Hb A und Hb D des Wollkopfgeiers (WG) im Vergleich zu den entsprechenden Ketten der Hämoglobine des Mönchsgeiers (MG) (37)

MG α A	NA	1	A	10	AB	B	20
WG α A	Val.		Leu-Ser-Ala-Asn-Asp-Lys-Thr-Asn-Val-Lys-Thr-Val-Phe-Thr-Lys-Ile-Thr-Gly-His-Ala-Glu-Asp-Tyr-				
WG β	Val	1	His-Trp-Thr-Ala-Glu-Lys-Gln-Leu-Ile-Thr-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-	10			20
MG β	NA						
MG α A	A					B	
WG α A		30	C	40	CD		
WG β							
MG β							
MG α A							
WG α A		50	E	60			
WG β							
MG β							
MG α A							
WG α A		70	EF	80	FG		90
WG β							
MG β							
MG α A							
WG α A		100	G	110	GH		H
WG β							
MG β							
MG α A							
WG α A		120		130	HC		140
WG β							
MG β							

D: D I S K U S S I O N

15. Molekulare Mechanismen der Höhenatmung

15.1. Struktur und Funktion des Hämoglobins

Eisenporphyrinproteine sind direkt oder indirekt an der Verwertung des Sauerstoffs für biologische Oxidationsvorgänge beteiligt. Die katalytische Funktion kann in der reversiblen Bindung von Sauerstoff, im Sauerstofftransfer auf Substrate oder im Elektronentransport (Atmungskette) liegen.

Essentiell für die Atmung aller Vertebraten ist Hämoglobin, welches den Transport der Blutgase (O_2 , CO_2) zwischen den respiratorischen Membranen und den Geweben vollzieht.

Molekularer Sauerstoff wird reversibel an das zentrale Eisenatom des Porphyrins gebunden. Dieser Mechanismus wird durch verschiedene heterotrope Liganden (H^+ ⁽³⁸⁾, Cl^- ⁽³⁹⁾, D-2,3-Bisphosphoglycerat (DPG) ⁽⁴⁰⁾ und $NADH/NADP^+$ / $NADPH$ ⁽⁴¹⁾) reguliert, welche sich an definierte, genau bekannte Aminosäuren der je zwei α - und β -Ketten des tetrameren Moleküls anlagern. Die Aufnahme von H^+ unter Freisetzung von O_2 ist als alkalischer Bohreffekt bekannt. Die Bindung dieser Liganden ist mit der Oxygenierung des Häms über die Gleichgewichtseinstellung der zwei Quartärstrukturen, der T-(tense)-Struktur (desoxy-Hb) und der R-(relaxed)-Struktur (oxy-Hb) korreliert ⁽⁴²⁾.

In der T-Struktur sind die vier Untereinheiten durch Salzbrücken der heterotropen Liganden stabilisiert, so daß die O_2 -Affinität erniedrigt ist. In der R-Struktur sind die Untereinheiten frei von funktioneller Spannung, was eine erhöhte Sauerstoffaffinität zur Folge hat. Die Kooperativität der Oxygenierung resultiert aus dem Übergang der Quartärstrukturen.

Die Tertiärstruktur jeder Untereinheit wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen nicht-polaren Gruppen und durch Hämkontakte stabilisiert. Nach Oxygenierung zeigen die α - β_2 -Bindungsstellen und die Bindungsstellen für nicht-Häm-Liganden signifikante Konformationsänderungen ^(43,44).

Das Studium abnormaler Human-Hämoglobine ⁽⁴⁵⁾ erlaubt Aussagen über die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion. So führen Änderungen im Inneren des Moleküls (Hämtasche) sowie die Einführung eines Prolinrestes in helikale Bereiche zu Instabilität und/oder Hämverlust. Die Sauerstoffaffinität kann durch Mutationen an den Bindungsstellen der Untereinheiten und der Liganden verändert werden.

Die Hämoglobine der Vögel sind funktionell dem des Menschen vergleichbar. Bei adulten Vögeln liegt statt DPG myo-Inosit-D-1,3,4,5,6-pentaphosphat (IPP) ^(46,47) als allosterischer Effektor vor, welcher mit den Seitenketten von 12 Aminosäuren der β -Ketten ⁽⁴⁸⁾ in Kontakt ist.

Das Zusammenwirken verschiedener Aminosäuren bei der Sauerstoffaufnahme und -abgabe zeigt, daß ein Minimum an Mutationen ein Maximum an Anpassung an definierte Bedingungen erlaubt. Die Mechanismen der molekularen Genetik (Genduplikation) ergänzen diese Feinregulation. Das Auffinden adaptiver Austausche wird durch vergleichende Sequenzinterpretation auf der Basis des für Humanhämoglobin entwickelten Röntgenstrukturmodells erzielt: durch sorgfältige Auswertung der 40000 bekannten Sequenzen, sowie der 500 abnormalen Hämoglobine kann die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäurereste beurteilt werden; hierbei ist wichtig, die Primärstrukturen der Hämoglobine nahe verwandter Tierarten einander gegenüberzustellen, so daß evolutionär bedingte Mutationen minimiert werden.

15.2. Physiologie des Hämoglobins in großen Höhen

Veränderungen in der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins werden viel diskutiert, um Anpassungen des Menschen an große Höhen zu erklären ^(49,50). Die Größe der O_2 -Affinität wird als $P_{50}O_2$ ausgedrückt; dieser Wert entspricht dem O_2 -Partialdruck, bei dem Hämoglobin mit O_2 halb gesättigt ist. Je kleiner der Wert ist, desto größer ist die Affinität zum Sauerstoff.

Der adaptive Wert der Form der Sauerstoff-Dissoziationskurve des Hämoglobins ist umstritten: Erhöhte Sauerstoffaffinität (Linksverlagerung der Kurve, s. Abb. 29) gewährleistet ausreichende arterielle Oxygenierung des Hämoglobins, selbst unter hypoxischen Bedingungen ⁽⁵¹⁾. Die Abgabe des Sauerstoffs an die Gewebe ist jedoch erschwert. Erleichtert ist diese bei einem Hämoglobin mit erniedrigter Sauerstoffaffinität (Rechtsverlagerung der Kurve, s. Abb. 29) auf Kosten der arteriellen Sättigung ⁽⁵²⁾.

Blut von Menschen, welche in großen Höhen (über 3000m) leben, zeigt beide Mechanismen. Erniedrigte O_2 -Affinität bei erhöhtem DPG-Spiegel wurde bei den Quechua Indianern der Anden von Peru (4000m) nachgewiesen ⁽⁵³⁾. Diese verfügen zusätzlich über einen erhöhten Bohreffekt, wodurch die Affinität bei niedrigem pH-Wert im Gewebe weiter sinkt.

Erhöhte Sauerstoffaffinität ist charakteristisch für die Sherpas des Himalayas (4000m) ⁽⁵⁴⁾. Es ist nicht hinreichend geklärt, wie die Freisetzung des Sauerstoffs an das Gewebe optimiert wird.

Die Vorteile erhöhter Sauerstoffaffinität des Blutes für das Leben in gemäßigten bis extremen Höhen wurden sowohl theoretisch ⁽⁵⁵⁾ als auch experimentell an Ratten ^(56,57) und am Menschen ⁽⁵⁸⁾ demonstriert.

Nach jüngeren Studien ^(59,60) sind diese physiologischen Effekte (Änderungen des pH-Wertes und der DPG-Konzentration) für Leben unter hypoxischen Bedingungen von untergeordneter Bedeutung.

Molekulare Mechanismen der Höhenatmung sind bisher bei höhenangepaßten Säugern aufgeklärt

worden; deren Blut und Hämoglobine zeigen erhöhte Sauerstoffaffinität als Ergebnis reduzierter Wechselwirkung mit allosterischen Effektoren: bei den Hämoglobinen des Vikunja (*Lama vicugna*) ist die Wechselwirkung mit Chloridionen vermindert⁽⁶¹⁾; Hämoglobine des Elefanten (*Elephas maximus*, *Loxodonta africana*)^(62,63), des Lamas (*Lama glama*)^(64,65), des Gürteltieres⁽⁶⁶⁾ und des Rhinoceros⁽⁶²⁾ weisen eine inaktivierte Phosphatbindungsstelle auf.

Reduzierte Phosphat-Hb-Wechselwirkung sichert ausreichende Oxygenierung des fötalen Humanhämoglobins, so daß trotz erniedrigten Sauerstoffpartialdruckes des fötalen Kreislaufs die Sauerstoffversorgung des Babys gewährleistet ist⁽⁶⁷⁾.

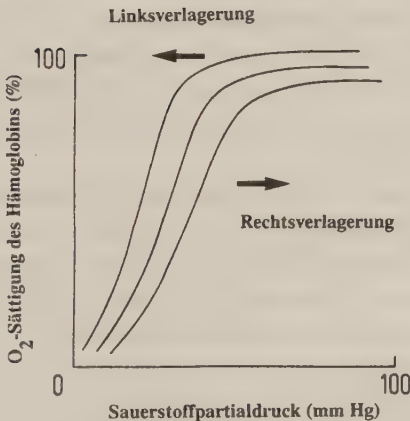


Abb.29: Sauerstoffbindungskurven des Hämoglobins

Die mittlere Kurve gilt für Human-Hb unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4, $\text{CO}_2 = 40 \text{ mm Hg}$, $T = 37^\circ \text{C}$). Linksverlagerung bedeutet eine Zunahme, Rechtsverlagerung eine Abnahme der Sauerstoffaffinität. $P_{50}\text{O}_2$ für Human-Hb = 26,8 mm Hg (nach L. Stryer, Biochemie, 3. Auflage, 1985, Vieweg VG, Braunschweig)

16. Molekularbiologie der Höhenatmung der Gänse

Streifengänse brüten in den Hochebenen der Nordmongolei (4000 - 6000m), überwintern aber in Indien ⁽⁶⁸⁾. Dazu fliegen sie zweimal im Jahr über den höchsten Gipfel des Himalayas, den Mt. Everest (8848m) ⁽²⁾. Andengänse sind höhenangepaßte Spezies, welche in den Hochländern der Anden (6000m) beheimatet sind.

Physiologische Messungen haben gezeigt, daß sowohl das Hämoglobin der Streifengans ⁽⁶⁹⁾, als auch der Andengans ⁽⁴⁾ eine hohe Sauerstoffaffinität besitzt (P_{50O_2} Streifengans 29.7 mm Hg, Andengans 28 mm Hg, vgl. Graugans 39.5 mm Hg).

Der molekularen Klärung der physiologischen Daten dienen die Primärstrukturen der Hauptkomponente Hb A und der Minorkomponente Hb D, welche sich nur in den α -Ketten unterscheiden.

16.1. Hämoglobine der Streifengans

Die Hämoglobine der Grau- und Streifengans differieren in den β -Ketten ^(35,36) in einer, in den α^A -Ketten ^(35,36) in drei und in den α^D -Ketten in vier Aminosäuresubstitutionen.

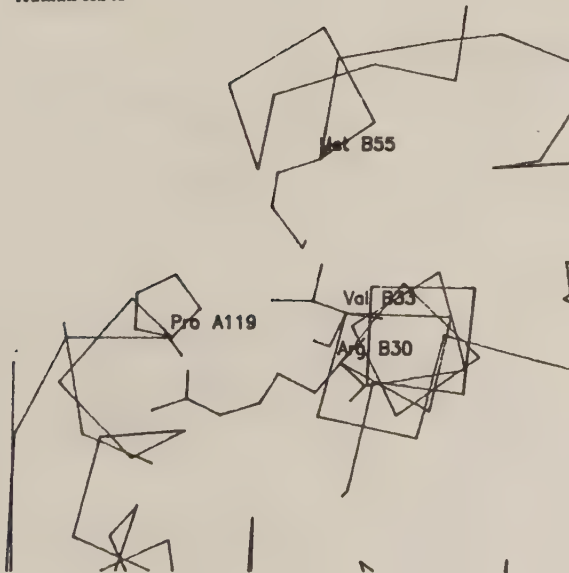
Bedeutung in struktureller und funktioneller Hinsicht kommt dem Austausch α^A 119 Prolin (Graugans) $\rightarrow$ Alanin (Streifengans) zu, der bei den Hämoglobinen der Vögel bisher nicht beobachtet worden ist (s. Tab. 17).

α 119 Prolin bildet eine $\alpha\beta_1$ -Bindungsstelle mit β 55 Leucin durch van der Waals-Kräfte in der Desoxystruktur ⁽⁴²⁾. Bei α 119 Alanin ist diese Wechselwirkung aufgrund der kurzen Seitenkette des Alanins nicht mehr gegeben (s. Abb. 30). Die Desoxystruktur des Hb A wird zugunsten der höheraffinen Oxystruktur geschwächt; die Abwesenheit dieses Austausches in Hb D bedeutet eine erniedrigte Affinität der Minorkomponente. Physikalisch bildet sich hier eine diffusionskontrollierte O_2 -Kaskade aus zwei Komponenten: das hochaffine Hb A gewährleistet ausreichende O_2 -Aufnahme, selbst in 9000m Höhe, wohingegen das niedrigaffine Hb D die Gewebssättigung sichert. Hb A: Hb D wurden im Verhältnis 9 : 1 gefunden. Es erscheint möglich, daß durch humorale Stimulation vor der Migration ⁽⁷⁰⁾ die Expression von Hb D und damit der Wirkungsgrad der Kaskade erhöht wird.

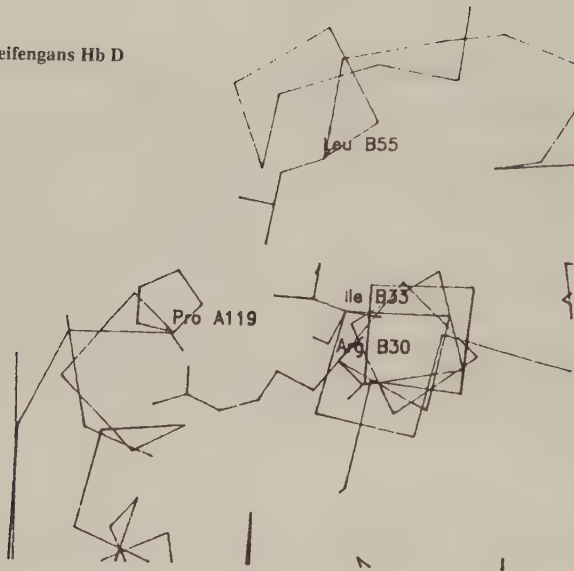
Aminosäure exprimiert in Hb der			Aminosäure sonst
Position	Streifengans	Andengans	exprimiert
α^A 119	Ala	Pro	Pro
α^D 119	Pro	Pro	Pro
β 55	Leu	Ser	Leu/Ile *

Tab. 17: Überblick über Aminosäuren, welche an α 119 und β 55 (α, β -Wechselwirkung) in Hb A und Hb D der Vögel exprimiert werden
 * β 55 Thr ist in den β -Ketten des Weißstörches exprimiert (76)

Human Hb A



Streifengans Hb D



Streifengans Hb A

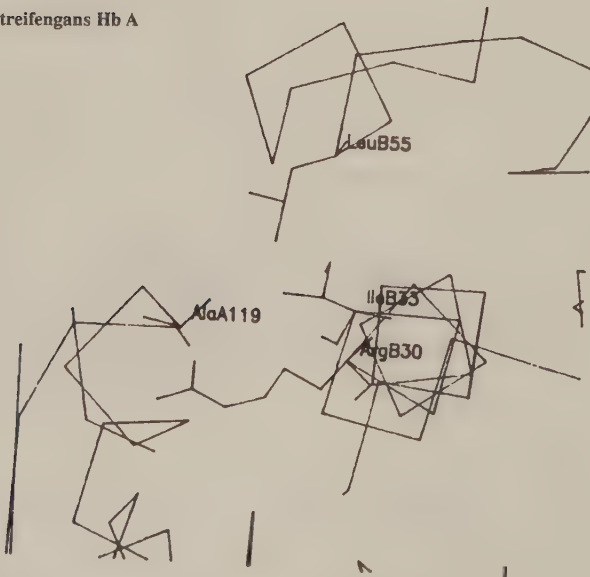


Abb. 30: Strukturdiagramm der $\alpha\beta$ -Bindungsstelle der Hämoglobine Hb A und Hb D der Streifengans im Vergleich zur entsprechenden Stelle des Humanhämoglobins. $\alpha 119$ bildet einen van der-Waals-Kontakt mit $\beta 55$. Die Substitution $\alpha 119$ Prolin $\rightarrow$ Alanin in Hb A führt zu interatomarer Destabilisierung der Bindungsstelle und hiermit zu höherer O_2 -Affinität.

16.2. Hämoglobine der Andengans

Die α^A - und α^D - Ketten der Hämoglobine der Andengans differieren von denen der Graugans in je neun, die β -Ketten in sieben Aminosäureaustauschen.

Bedeutung für die hohe O_2 -Affinität kommt der Substitution $\beta 55$ Leucin (Graugans) $\rightarrow$ Serin (Andengans) zu. In den Hämoglobinen der Vögel ist für $\beta 55$ Leucin oder Isoleucin exprimiert (s. Tab. 17). $\beta 55$ bildet einen van der Waals-Kontakt mit $\alpha 119$ (α^A , α^D Prolin) in der Desoxystruktur (42). Austausch des hydrophoben Leucins gegen das hydrophile Serin unterbricht diese Wechselwirkung aufgrund der polaren Seitenkette des Serins (s. Abb. 31). Dieser Verlust interatomarer Stabilisierung schwächt die T-Struktur beider Hämoglobine und erklärt die erhöhte Sauerstoffaffinität des Blutes.

Die funktionellen Eigenschaften der Hämoglobine werden hier über die gleiche Bindungsstelle zwischen den Untereinheiten reguliert wie im Hämoglobin der Streifengans.

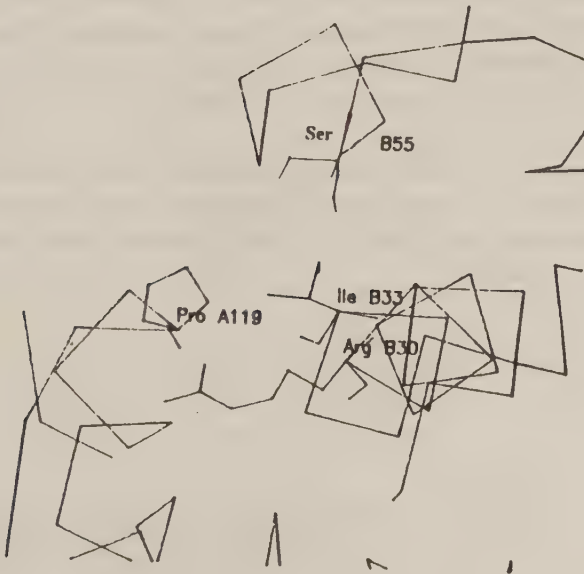


Abb. 31: Strukturdiagramm der $\alpha\beta$ -Bindungsstelle der Hämoglobine Hb A und Hb D der Andengans $\alpha 119$ bildet einen van-der-Waals-Kontakt mit $\beta 55$. Die Substitution $\beta 55$ Leucin $\rightarrow$ Serin führt zu interatomarer Destabilisierung der Bindungsstelle und hiermit zu höherer O_2 -Affinität.

16.3. Bedeutung der Bindungsstelle $\alpha_1119\text{-}\beta_155$ für die Höhenatmung

Die Hämoglobine der Andengans und der Streifengans zeigen die funktionelle Bedeutung der Bindungsstelle $\alpha_1119\text{-}\beta_155$ für die Molekularbiologie der Höhenatmung der Gänse, wobei Mutationen sowohl auf den α - (Streifengans) als auch auf den β - (Andengans) Ketten determinierend sind.

Die Lebensbedingungen beider Gänse lassen auf die molekulare Funktion der α - und β -Ketten schließen: Streifengänse, welche Höhen vom Meeresspiegel bis 9200m durchqueren, benötigen Hämoglobine für eine rasche Anpassung an wechselnde O_2 -Partialdrücke. Blut mit unterschiedlich affinen Hämoglobinen erlaubt einen größeren Regulationsbereich der Sauerstoffaufnahme und -abgabe.

Der Bereich der normalen Hämoglobinfunktion wird durch einen Gradienten der O_2 -Affinitäten erweitert. Die Expression von zwei α -Ketten erlaubt die gezielte funktionelle Beeinflussung nur einer Hämoglobinkomponente.

Andengänse gehören zur eingeborenen Tierwelt der Anden. Ihre Hämoglobine sind seit Generationen der gleichen, hypoxischen Umgebung ausgesetzt; ein Aminosäureaustausch in den β -Ketten paßte beide Hämoglobine diesem Lebensraum an, wobei ein Minimum an Mutationen (Einpunktmutation an der 2. Base des Triplets für Leucin änderte das Codewort zu Serin) eine effiziente Erhöhung der O_2 -Affinität verursacht hat. Die beiden Hämoglobine sind dadurch funktionsgleich. Diese Gänse sind somit den höhenangepaßten Säugern der Anden, welche bei Expression nur einer Hb-Komponente erhöhte intrinsische Sauerstoffaffinität zeigen, vergleichbar.

Hohe O_2 -Affinität des Blutes sichert eine vollständigere O_2 -Beladung in der Lunge. Ausreichende Gewebssättigung könnte durch ein angepaßtes Myoglobin gegeben sein. Es ist nachgewiesen, daß Myoglobin den Sauerstofftransport in die Gewebe erleichtert durch vollständigere Extraktion des Sauerstoffes aus dem arteriellen Blut ⁽⁷¹⁾.

17. Molekularbiologie der Höhenatmung der Greifvögel

Greifvögel sind bekannt für ihre Fähigkeit, sehr hoch zu fliegen (4500-5500m)⁽⁷²⁾. Extreme Höhen erreichte ein Sperbergeier, welcher in 11300 m Höhe mit einem Flugzeug kollidiert war⁽⁵⁾. Meine molekularbiologischen Untersuchungen zeigen, daß diese ungewöhnliche Hypoxietoleranz sich auf eine genetisch definierte Basis gründet und durch physiologische Untersuchungen völlig bestätigt wird.

17.1. Hämoglobine des Sperbergeiers

Blut des Sperbergeiers zeigt einen ungewöhnlichen, hier erstmals beschriebenen Polymorphismus: es werden vier Hämoglobine, zwei Haupt-(Hb A/Hb A') und zwei Nebenkomponten (Hb D/Hb D') nachgewiesen. Die α^A -Ketten differieren nur an α 34 ($\alpha^A = \text{Thr}/\alpha^{A'} = \text{Ile}$), die α^D -Ketten nur an α 104 ($\alpha^D = \text{Cys}/\alpha^{D'} = \text{Asn}$).

Die Anzahl der Mutationen der Globinketten des Sperbergeiers zu denen des Mönchsgeiers und des Wollkopfgeiers ist niedrig. Einen Überblick über die Austausche gibt Tab. 18; die β -Ketten der drei Spezies sind identisch.

Pos	SG	MG	WG
α^A 12	Asn	Thr	Thr
α^A 34	Thr	Ile	Ile
α^A 137	Thr	Thr	Ser
α^D 12	Thr	Ala	Ala
α^D 38	Gln	Pro	Pro
α^D 123	Ser	Ala	Ala

Tab. 18: Aminosäureaustausche der α^A - und α^D -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers (SG), Mönchsgeiers (MG) und des Wollkopfgeiers (WG)

17.2. Physiologie der Hämoglobine des Sperbergeiers

Abb. 32 zeigt die Sauerstoffsättigungskurven für die Hämoglobine des Sperbergeiers und des Mönchsgeiers als biologischer Referenz. Die P_{50} -Werte betragen bei pH 7.3 für den Sperbergeier 13 mm Hg (-IHP) und 23 mm Hg (+ IHP), für den Mönchsgeier 21.5 mm Hg (-IHP) und 31 mm Hg (+ IHP). Hämoglobine des Wollkopfsgeiers zeigen einen P_{50} kleiner 10 mm Hg*.

Auffallend ist, daß die Wirkung von IHP im Bereich niedriger Sättigung deutlich ausgeprägt ist, wohingegen der Effekt bei hoher Sättigung vernachlässigbar ist. Dies bedeutet, daß mehr Sauerstoff von den Lungen zu den Geweben transportiert wird, zumal Reduktion der Sauerstoffaffinität bei venösem O_2 -Partialdruck (O_2 -Gleichgewichtskurve steiler, vgl. Abb.29) von größerem Einfluß ist, als bei arteriellen Werten (Kurve flacher, vgl. Abb.29).

Die O_2 -Affinitäten der getrennten Komponenten des Sperbergeiers wurden gemessen. Tab. 19 gibt einen Überblick über die P_{50} -Werte in Anwesenheit und Abwesenheit von IHP. Eine Wechselwirkung der Hämoglobine untereinander war nicht nachzuweisen. Auf die Messung von Hb D' wurde aufgrund gleicher funktionsdeterminierender Aminosäuren verzichtet.

Es zeigen sich abgestufte O_2 -Affinitäten, wobei Hb A die niedrigste, Hb D die höchste Affinität aufweist. Zusatz von organischem Phosphat multipliziert die Affinitätsunterschiede um den Faktor zehn; auffällig ist der signifikante Einfluß auf Hb A/Hb A'.

P_{50}	-IPP	+ IPP	%
Hb A	6.17 mm Hg	34.6 mm Hg	48
Hb A'	5.00 mm Hg	23.4 mm Hg	24
Hb D	4.00 mm Hg	14.5 mm Hg	25

Tab.19: Überblick über die P_{50} -Werte der Hämoglobin-Komponenten des Sperbergeiers (pH 7.4; 0.1 M HEPES-Puffer; 1 M KCl; 38°C)

* R.E. Weber, persönliche Mitteilung

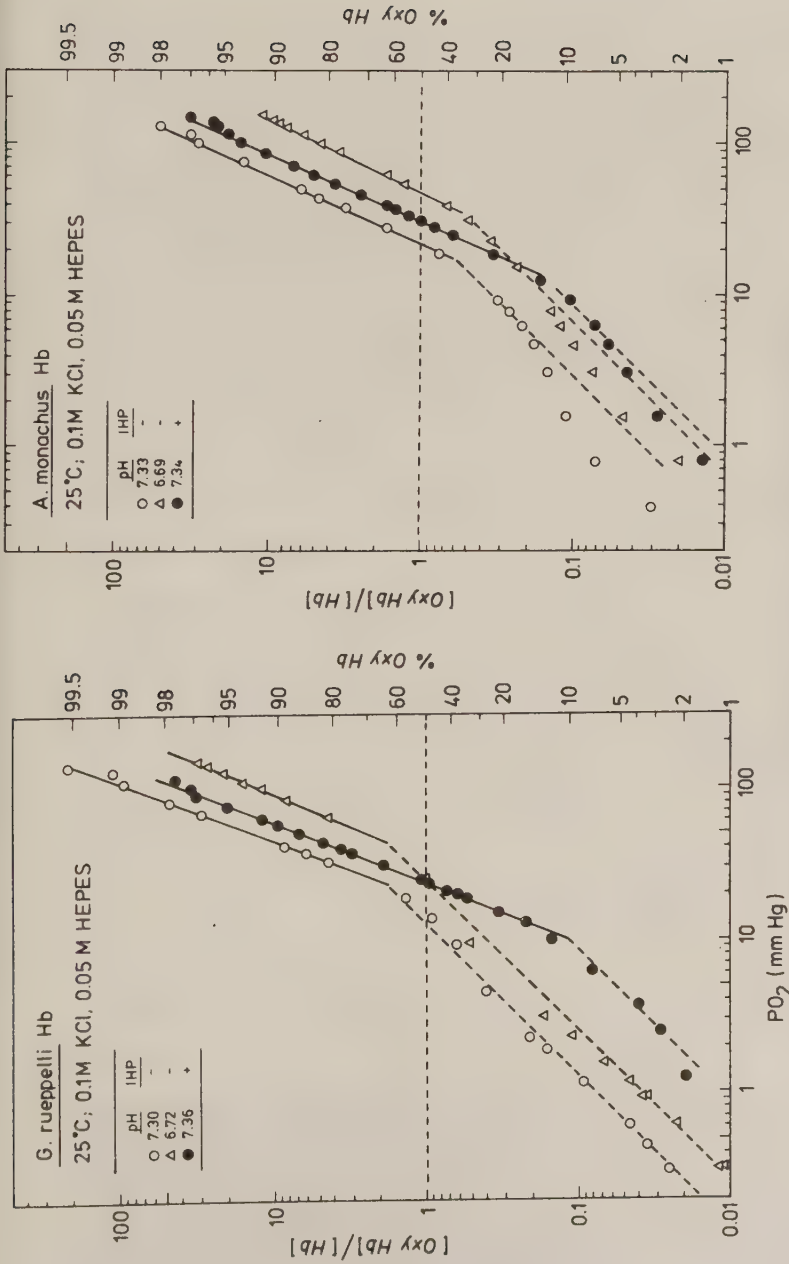


Abb. 32: Sauerstoffsättigungskurve für die Hämoglobine des Sperbergeiers (*Gyps rueppelli*) und Mönchsgeiers (*Agypius monachus*), gemessen in Bereichen hoher und niedriger Sättigung. Die O_2 -Affinitäten wurden mittels modifizierter Diffusionskammertechnik (73) bestimmt in einem Radiometer BMS-2, Mk-2 (Kopenhagen), welches an Wösthoff Gasmischpumpen angeschlossen war (Wösthoff, Bochum). Der O_2 -Gehalt wurde in einem O_2 -Analysator (Lexington Instruments Co.) ermittelt. Es kam Inosinhexaphosphat, Dinatriumsalz, $\frac{1}{2}$ IHP zur Anwendung, welches dem physiologisch äquivalenten IHP aufgrund einfacherer präparativer Darstellung vorgezogen wird.

17.3. Molekulare Grundlagen der Höhenatmung der Greifvögel

Aufgrund identischer β -Ketten der Hämoglobine der drei Taggreife sind die α -Ketten als die molekularen Modulatoren der Höhenatmung dieser Spezies zu betrachten.

Die α -Ketten zeigen eine konservierte Region von großer funktioneller Bedeutung: α_{34-38} enthält drei α_{β_1} - und zwei α_{β_2} -Bindungsstellen in Folge. Bei den α^A -Ketten ist das C-terminale Pro (α_{38}), bei den α^D -Ketten das N-terminale Ile (α_{34}) dieses Ausschnittes konserviert. Die Sequenz Thr-Tyr-Pro ist bei allen Hämoglobinen der Greifvögel gleich (s. Tab. 20).

α^A_{38} Prolin ist bisher nur bei den Hämoglobinen der Greifvögel beobachtet worden (Ausn. Hb A des Huhns⁽⁷⁴⁾). Sonst wird an α^A_{38} Ser, Gln oder Thr gefunden.

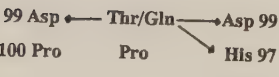
Position	34	35	36	37	38
SG α^A	Thr	Thr	Tyr	Pro	Pro
SG $\alpha^{A'}$	Ile	Thr	Tyr	Pro	Pro
MG α^A	Ile	Thr	Tyr	Pro	Pro
WG α^A	Ile	Thr	Tyr	Pro	Pro
HA α^A	Thr	Thr	Tyr	Pro	Pro
SG α^D	Ile	Thr	Tyr	Pro	Gln
SG $\alpha^{D'}$	Ile	Thr	Tyr	Pro	Gln
MG α^D	Ile	Thr	Tyr	Pro	Pro
WG α^D	Ile	Thr	Tyr	Pro	Pro
HA α^D	Ile	Thr	Tyr	Pro	Thr

Tab. 20: Überblick über die Modulatorregion der α -Ketten der Hämoglobine der Greifvögel (SG = Sperbergeier, MG = Mönchsgeier, WG = Wollkopfsgeier, HA = Habicht)
Wechselwirkung: $\alpha_{34,35,36} = \alpha_{\beta_1} / \alpha_{37,38} = \alpha_{\beta_2}$

Sowohl $\alpha 34$ als auch $\alpha 38$ nehmen definierten Einfluß auf die Struktur und Funktion der Hämoglobine, wie aus Untersuchungen an abnormalen Hämoglobinen des Menschen hervorgeht (s. Tab. 21).

$\alpha 34$ tritt mit $\beta 128(\text{Ala})$, $\beta 125(\text{Asp})$ und $\beta 124(\text{Pro})$ in Desoxy-Hb (T-Struktur), mit $\beta 128(\text{Ala})$ in Oxy-Hb (R-Struktur) in Wechselwirkung⁽⁴²⁾. Komponenten, welche Thr in $\alpha 34$ exprimieren, bilden eine Wasserstoffbrücke mit Asp ($\beta 125$), was eine Stabilisierung der T-Struktur (niedrige Affinität) bedeutet. Verlust dieser Wasserstoffbrücke in Komponenten mit $\alpha 34 = \text{Ile}$ erklärt deren erhöhte O_2 -Affinität (s. Abb. 33).

$\alpha 38$ ist in Wechselwirkung mit $\beta 99(\text{Asp})$ und $\beta 100(\text{Pro})$ in der T-Struktur, mit $\beta 99(\text{Asp})$, $\beta 97(\text{His})$ und $\beta 41(\text{Phe})$ in der R-Struktur⁽⁴²⁾. Da die R-Struktur in Komponenten mit $\alpha 38 = \text{Thr/Gln}$ durch zwei H-Brücken stabilisiert werden kann (Thr-Asp, Thr-His), wird sie durch den Verlust der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten stärker destabilisiert als die T-Struktur (eine H-Brücke, Thr-Asp). Dies bedeutet, daß das Gleichgewicht zwischen T- und R-Struktur für Komponenten mit $\alpha 38 = \text{Thr}$ zugunsten der R-Struktur (höhere O_2 -Affinität) verlagert wird, wohingegen bei $\alpha 38 = \text{Pro}$ das Gleichgewicht auf Seiten der T-Struktur (niedrige O_2 -Affinität) liegt (s. Tab. 21).

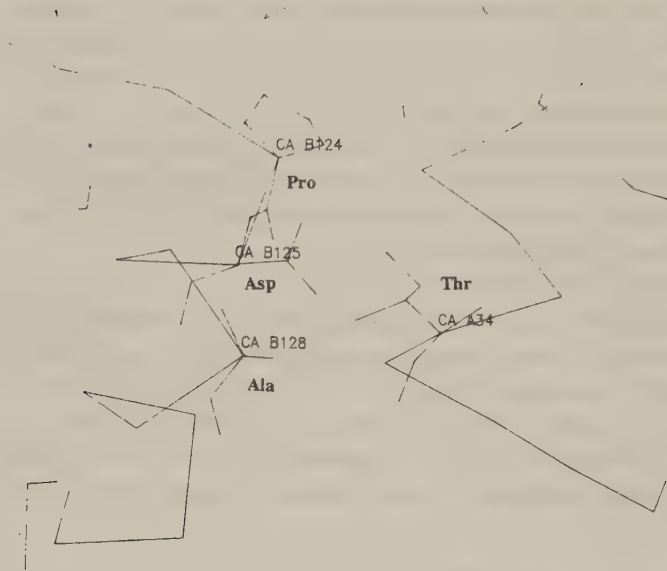
T-Struktur (Desoxy-Hb)	R-Struktur (Oxy-Hb)	Abnormale Humanhämoglobine	
β	β		
$\alpha 38$		$\beta 99 \text{ Asp} > \text{Asn}$	Hb Kempsey (+)
		$\beta 99 \text{ Asp} > \text{His}$	Hb Yakima (+)
		$\beta 99 \text{ Asp} > \text{Ala}$	Hb Radcliffe (+)
		$\beta 99 \text{ Asp} > \text{Tyr}$	Hb Ypsilanti (+)
		$\beta 99 \text{ Asp} > \text{Gly}$	Hb Hotel-Dieu (+)
		$\beta 99 \text{ Asp} > \text{Val}$	Hb Chemilly (+)
		$\beta 100 \text{ Pro} > \text{Leu}$	Hb Brigham (+)
			
$\alpha 34$			
	Ala 128	$\beta 97 \text{ His} > \text{Gln}$	Hb Malmö (+)
128 Ala			
125 Asp			
124 Pro			

Tab. 21: Überblick über die funktionsdeterminierenden Wechselwirkungen der Untereinheiten der Hämoglobine der Greifvögel. Pfeile geben Wasserstoffbrücken an. $\alpha 34$ Thr stabilisiert die niedrigaffine T-Struktur durch eine zusätzliche H-Brücke zu $\beta 125 \text{ Asp}$ (α, β -Wechselwirkung). $\alpha 38 \text{ Pro}$ führt zu einer stärkeren Destabilisierung der höheraffinen R-Struktur durch Verlust von zwei H-Brücken (α, β -Wechselwirkung).

Die Beispiele abnormaler Hämoglobine des Menschen zeigen, daß eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität (= Verlagerung des Gleichgewichts zugunsten der höheraffinen Oxystruktur) sowohl durch Reste, welche die Desoxystruktur schwächen ($\beta 99$ und $\beta 100$), als auch durch Reste, welche die Oxystruktur stabilisieren ($\beta 97$), bewirkt werden kann; Austausche an $\alpha 38$, sowie an $\alpha 34$ sind bisher nicht beobachtet worden (vgl. Liste abnormaler Hämoglobine in: Hemoglobin, (1986) 10(3), 259-260).

(+) = Erhöhung der Sauerstoffaffinität
Human $\alpha 34 = \text{Leu}$, $\alpha 38 = \text{Thr}$

Sperbergeier Hb A



Sperbergeier Hb A'

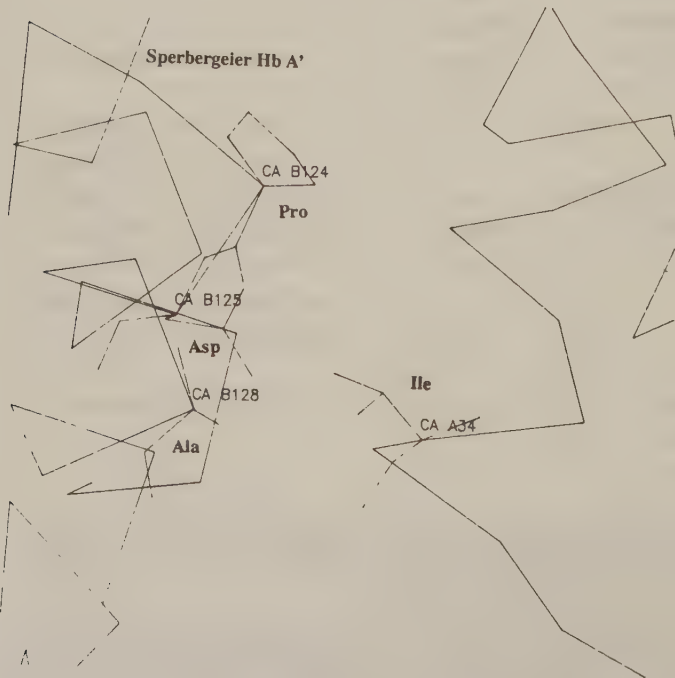


Abb.33: Strukturdiagramm der $\alpha\beta$ -Bindungsstelle ($\alpha 34$) in Hb A und Hb A' des Sperbergeiers. Bei $\alpha 34$ Thr (Hb A) ist Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu $\beta 125$ Asp möglich, nicht bei $\alpha 34$ Ile (Hb A')

17.4. Affinitätskontrollierte Kaskade multipler Hämoglobine

Tab. 22 gibt einen Überblick über die funktionsdeterminierenden Aminosäurereste der Hämoglobine der Greifvögel einschließlich deren Effekte auf die O_2 -Affinität, wie auf der Basis des für Humanhämoglobin entwickelten Röntgenstrukturmodells erwartet.

	SG	MG	WG	HA
α^A_{38}	Pro (-)	Pro (-)	Pro (-)	Pro (-)
α^A_{34}	Thr (-)	Ile (+)	Ile (+)	Thr (-)
$\alpha^{A'}_{38}$	Pro (-)	---	---	---
$\alpha^{A'}_{34}$	Ile (+)	---	---	---
α^D_{38}	Gln (+)*	Pro (-)	Pro (-)	Thr (+)
α^D_{34}	Ile (+)*	Ile (+)	Ile (+)	Ile (+)
% Hb D	25*	19	30	15

Tab. 22: Überblick über die Aminosäurereste des Hämoglobins, welche für den molekularen Mechanismus der Höhenanpassung der Greifvögel determinierend sind.
+/- O_2 -Affinität des Hämoglobins wird durch Expression dieser Aminosäure erhöht/erniedrigt (bei Bezug auf das Röntgenstrukturmodell des Humanhämoglobins)

* einschließlich Hb D'

SG = Sperbergeier, MG = Mönchsgeier, WG = Wollkopfgeier, HA = Habicht

Die vollkommen übereinstimmenden Ergebnisse der Physiologie (Tab. 19), der Röntgenstrukturanalyse ⁽⁴²⁾ und der Molekularbiologie (Tab. 22) zeigen, daß die Hämoglobine des Sperbergeiers sich in drei Gruppen unterschiedlicher Affinität und Funktion gliedern lassen: das hochaffine Hb D/D' (25%) nimmt den Sauerstoff aus der hypoxischen Umgebung auf; diffusionskontrolliert wird dieser über Hb A' (22%) mittlerer Affinität an das niedrigaffine Hb A (46%) abgegeben, welches ausreichende Gewebssättigung gewährleistet.

Diese feinregulierte Kaskade, genomisch determiniert durch Mutationen an zwei Bindungsstellen der Untereinheiten des Hämoglobins, ist als das molekulare Prinzip zu betrachten, welches ein Überleben des Sperbergeiers in 11300m Höhe ermöglichte.

Die höhere Affinität des Hämolyates des Sperbergeiers im Vergleich zu dem des Mönchsgeiers resultiert aus dem Anteil der sehr affinen Minorkomponente des Sperbergeiers.

17.5. Erhöhter Phosphateffekt bei Hämoglobin A/A' des Sperbergeiers

Die O_2 -Affinität der Hämoglobine adulter Vögel wird durch Bindung von IPP erniedrigt ^(46,47), wodurch die O_2 -Freisetzung erleichtert wird. Begleitet ist dieser Vorgang von einer Veränderung der Quartärstruktur des Moleküls (R- → T-Struktur). Unterschiedlicher Einfluß organischer Phosphate auf die Hämoglobinkomponenten der Vögel wurde nachgewiesen ⁽⁷⁵⁾, jedoch nicht in der Größenordnung von Hb A/Hb A' des Sperbergeiers (Tab. 19). Da an den Phosphatbindungsstellen der β -Ketten ⁽⁴⁸⁾ keine Austausche vorhanden sind, stellt sich das bisher ungelöste Problem, inwieweit die α -Ketten in dieser Hinsicht von Einfluß sind ^(76,77).

Eine signifikante Strukturänderung bewirkt $\alpha^A/\alpha^{A'}$ 38 Prolin. Die aus sieben Aminosäuren bestehende C-Helix (Pos. 36-42) enthält dadurch zwei benachbarte Prolinreste (α 37/38; α 37 ist bereits Prolin), welche durch sterische Hinderung ihrer Seitenkette zu partieller bis vollständiger Auflösung der helikalen Struktur führen. Dies hat einen definierten strukturellen Einfluß zur Folge, da der Übergang der Quartärstrukturen von einer relativen Verschiebung der Bereiche C α und FG β um 6 Å begleitet ist ⁽⁴²⁾. Nach dem Schlüssel-Schloß Prinzip lagert sich in der T-Struktur C6 α 41 Threonin in die Kavität der Oberfläche der β -Ketten bei FG 5 β Valin ein, in der R-Struktur C3 α 38 Threonin. Austausch $\alpha^A/\alpha^{A'}$ 38 Prolin führt zu sterischer Hinderung des Überganges der beiden Strukturen. Dies ermöglicht eine verstärkte Bindung organischer Phosphate, sowohl aus thermodynamischen (Überwiegen der T-Struktur im Gleichgewicht, welche höhere Affinität zu Phosphat besitzt) als auch aus strukturellen Gründen (Vergrößerung der Bindungsstelle für Phosphat).

17.6. Habicht als potentiell hypoxietolerant

Tab. 22 zeigt, daß Hb A und Hb D des Habichts unterschiedliche O_2 -Affinitäten aufweisen; es läßt sich eine biphasische Kaskade konstruieren, vergleichbar den Hämoglobinen der Streifengans (s. 16.1): hochaffines Hb D dient der O_2 -Aufnahme bei niedrigen O_2 -Partialdrücken, niedrigaffines Hb A sichert ausreichende Gewebssättigung. Überleben des Habichts in großen Höhen (bis 9000m) erscheint deshalb bezüglich des molekularen Einflusses der Hämoglobine möglich, ist aber bisher nicht beschrieben worden.

17.7. Mönchsgeier und Wollkopfgeier als molekularbiologisch hypoxieintolerant

Hämoglobine des Mönchsgeiers und des Wollkopfgeiers zeigen keine Kaskade bzgl. der O_2 -Affinitäten. Hb A und Hb D unterscheiden sich nicht in ihrem Verhalten der O_2 -Aufnahme und -abgabe. Daraus läßt sich kein adaptiver Vorteil für transitorische Anpassungen an große Höhen ableiten. Permanenter Aufenthalt in definierten Höhen erscheint jedoch für den Wollkopfgeier aufgrund der erhöhten O_2 -Affinität begünstigt (vgl. Hb der Andengans, 16.2).

Die Affinitätsdifferenz zwischen den Hämoglobinen des Mönchsgeiers und Wollkopfgeiers muß eine Folge des einzigen Sequenzunterschiedes α^A_{137} Threonin $\rightarrow$ Serin sein. α Serin ist weder für Hb A (gewöhnlich Threonin) noch für Hb D (gewöhnlich Alanin) beobachtet worden. Für Humanhämoglobin ist ebenfalls keine Mutation an α_{137} Threonin bekannt. Um den molekularen Einfluß von α^A_{137} Serin (Wollkopfgeier) zu ermitteln, sind weitere Sequenzen der Hämoglobine der Greifvögel nötig. Möglicherweise spielt die Nähe zu einem Hämkontakt (α_{136}) eine Rolle.

18. Molekulare Mechanismen der Höhenatmung im Überblick

Tab. 23 zeigt die Mechanismen zur Erhöhung der Hypoxietoleranz der Vögel im Überblick.

Es läßt sich ableiten, daß für transitorische Anpassungen an große Höhen eine Kaskade der Sauerstoffaffinitäten der Hämoglobine adaptiv günstig ist.

Je geringer das O_2 -Angebot der Umgebung, desto empfindlicher muß die Kaskade reguliert sein. So reicht in großen Höhen (9000m) Modulation an einer Wechselwirkung der Untereinheiten (eine Wasserstoffbrücke) aus; bei extremen Höhen (11300m) wird dagegen Regulation an zwei Wechselwirkungen (zwei Wasserstoffbrücken) zur Bedingung. Mathematisch erfordert diese doppelte Regulation zu ihrer Wirksamkeit die Expression multipler Hämoglobine (bei zwei Modulatorstellen lassen sich theoretisch vier Affinitätsniveaus postulieren, wovon zwei in der Wirkung identisch sind - gleichen Einfluß der Bindungsstellen vorausgesetzt). Zusammen mit dem Vorgang der Genduplikation entstand somit für den Sperbergeier ein leistungsfähiges O_2 -Aufnahme und -transportsystem.

Das Affinitätsniveau der Kaskade ist speziesspezifischen Variationen unterworfen; die Frage nach dem Vorteil hoher oder niedriger O_2 -Affinität für Hypoxietoleranz reduziert sich hier auf das Problem der Affinitätsniveaus der Kaskade.

Dies trifft nicht auf permanent unter hypoxischen Bedingungen lebende Spezies (Andengans) zu. Hier scheint sich erhöhte O_2 -Affinität als adaptiv günstig durchgesetzt zu haben. Dies bestätigen auch die Untersuchungen an höhenangepaßten Säugern (s. 15.2.)

	Andengans (<i>Chloephaga melanoptera</i>)	Streifengans (<i>Anser indicus</i>)	Sperbergeier (<i>Gyps rueppellii</i>)
Hypoxietoleranz (Einwirkung)	6000m (permanent)	9000m (transitorisch)	11300m (transitorisch)
molekularer Mechanismus	Nucleotidaustausch	Nucleotidaustausch	Nucleotidaustausch Genduplikation
Wirkung auf Globinebene*	Schwächung der $\alpha_{119-\beta_{55}}$ - Wechselwirkung durch Austausch β_{55} Leu > Ser	Schwächung der $\alpha_{119-\beta_{55}}$ - Wechselwirkung durch Austausch α_{119} Pro > Ala	Modulation einer α_{β} - Wechselwirkung durch α_{34} Thr/Ile und einer α_{β} -Wechsel- wirkung durch α_{38} Gln/Pro Expression von vier Hb
Physiologische Konsequenz	Erhöhung der intrin- sichen O_2 -Affini- täten beider Hb	Erhöhung der intrin- sichen O_2 -Affini- tät von HbA Ausbildung einer Kaskade der Affinitäten	Ausbildung einer dreifachen, affini- tätskontrollierten Kaskade der Hb durch partielle Erhöhung und Er- niedrigung der intrinsichen Affinitäten der Hämoglobine

Tab. 23: Überblick über die molekularen Mechanismen der Höhenatmung der untersuchten Spezies.

* Die Beurteilung der interatomaren Wechselwirkung der Hämoglobine erfolgte auf der Basis des für Humanhämoglobin entwickelten Röntgenstrukturmodells.

Biologische Referenz für Anden- und Streifengans ist die Graugans, für den Sperbergeier der Mönchsgeier

19. Struktur und Funktion von Hb D

Blut der meisten adulten Vögel enthält zwei Hämoglobine, eine Hauptkomponente Hb A (ca. 85%) und eine Nebenkomponekte, Hb D (ca. 15%)⁽⁷⁸⁾. Beide Hämoglobine unterscheiden sich nur in den α -Ketten (α^A/α^D). Ferner wurde Hb D im Blut der Schildkröten nachgewiesen⁽⁷⁹⁾.

Die funktionelle Bedeutung von Hb D ist unklar, da einige Vögel nur eine Hauptkomponente exprimieren^(80,81,82).

Die α^D -Ketten zeigen strukturelle⁽⁸³⁾ und funktionelle⁽⁸⁴⁾ Ähnlichkeit zu den embryonalen α -Ketten der Vögel; ihre phylogenetische Distanz zu diesen ist geringer⁽⁸⁵⁾ als zu den α^A -Ketten, so daß sie als Produkt eines persistierenden embryonalen Gens gelten⁽⁸⁶⁾.

Physiologische Daten stützen diese Hypothese. So erhöhen organische Phosphate die Löslichkeit von Hb D in gleicher Weise wie die der embryonalen Hämoglobine⁽⁸⁷⁾. Ferner induzieren sowohl die embryonalen α -artigen, als auch die α^D -Ketten die Bildung stabiler Aggregate der entsprechenden Hämoglobine⁽⁸⁸⁾.

Ungeklärt ist die signifikant erhöhte Mutationsrate der α^D -Ketten bei Vergleich mit den α^A - und β -Ketten⁽⁸⁹⁾.

19.1. Das α^D -Gen - zwischen Aktivierung und Desaktivierung ?

Die Expression der α^D -Ketten ist bei Grau- und Streifengans deutlich reduziert (ca. 10%). Die Suche nach möglichen Ursachen führt zu dem Austausch $\alpha 96$ Valin $\rightarrow$ Alanin, welcher ausschließlich in den α^D -Ketten der Gänse beobachtet wird.

$\alpha 96$ liegt im funktionell wichtigen - und somit sehr konservierten - B $^{\alpha}$ -Bereich (Pos. 91-99) an der Grenze zwischen Exon 2/Intron 2⁽⁹⁰⁾. Dieser Genabschnitt gilt, ebenso wie der entsprechende A $^{\alpha}$ -Bereich (Pos. 39-48), als Erkennungsregion für das korrekte Spleißen der hnRNA^(90,91).

Eine Deletion von Codon 37-44 im $\psi\alpha_I$ -Gen des Menschen machte dieses zum Pseudogen⁽⁹²⁾.

Es ist zu untersuchen, ob die α^D -Gene der Vögel ein Glied in der Entwicklung zu einem Pseudogen darstellen, wie es für das β^{min} -Gen der Maus (20% Expression) postuliert worden ist⁽⁹²⁾.

Für diese Hypothese spricht auch eine ungewöhnliche Sequenz am 5'-Ende des 2. Introns im α^D -Globingen der Ente⁽⁹³⁾: die Mutation GT $\rightarrow$ GC, welche der Breathnach-Chambon-Regel⁽⁹⁴⁾ widerspricht, ist bei keinem funktionell aktiven Gen beobachtet worden⁽⁹⁵⁾. Abweichungen von der Konsensussequenz an den Intron/Exon-Grenzen wurden jedoch im 1. Intron des $\psi\alpha_I$ -Gen des Menschen⁽⁹²⁾ und in zwei Fällen von β^0 -Thalassämie^(96,97) mit dem Ergebnis abnormal gespleißter Gentranskripte gefunden.

Ferner sind Pseudogene meist zwischen den embryonalen und adulten Genen⁽⁹⁸⁾ lokalisiert; dies trifft auf die α^D -Gene zu⁽⁹⁹⁾.

Möglicherweise verfügen Vögel, welche keine α^D -Ketten exprimieren, über stumme α^D -Gene,

vergleichbar den δ -Genen der Altweltaffen⁽¹⁰⁰⁾. So ließe sich eine Entwicklung vom funktionell aktiven Gen mit reduzierter Expression zum Pseudogen (oder umgekehrt) verfolgen.

19.2. Hb D - biologische Reserve der Natur ?

Das Fehlen von α^D -Ketten im Blut einiger Vögel belegt, daß Hb A selbst die normale Hämoglobinfunktion gewährleisten kann.

Der biologische Vorteil der Expression multipler Hämoglobine muß sich auf die besondere Lebensweise der Vögel gründen: sie sind die Klasse der Vertebraten, welche den größten Lebensraum hinsichtlich des O_2 -Angebotes erschließen.

Beobachtungen zeigen, daß für den Menschen, dessen Blut zu 97% Hb A enthält, rasche Anpassungen an große Höhen nicht möglich sind⁽¹⁰¹⁾.

Es erscheint deshalb sinnvoll, daß Hb D bei Vögeln eine "biologische Reserve" zur situativen Erweiterung der normalen Hb-Funktion darstellt. Durch ein Minimum an Austauschen kann die physiologische Toleranz des Blutes ohne Einschränkung der normalen Hämoglobinfunktion erweitert werden.

Besonders Vögel, welche große Höhenunterschiede ohne zeitliche Anpassung zurücklegen, wie der Sperbergeier und die Streifengans, benötigen gezielt auf Veränderungen in der Umgebung ansprechende Hämoglobine. Bei diesen Spezies ist die gewöhnlich hohe Mutationsrate⁽⁸⁹⁾ der α^D -Ketten bei Vergleich mit nahe verwandten Spezies reduziert (s. Tab. 24).

Austausche	α^D	α^A	β
SG- MG	3	2	0
HA- MG	5	4	6
STG-GG	4	3	1
AG- GG	9	9	6

Tab.24: Aminosäureaustausche der Hämoglobine der höhenangepaßten Spezies Sperbergeier (SG), Streifengans (STG) und Andengans (AG) im Vergleich zu denen des Mönchsgeiers (MG) und der Graugans (GG) als nahe verwandte Spezies aus dem Flachland. Hb A und Hb D der Andengans sind funktionsgleich. Die Hämoglobine des Habichts (HA) sind als potentiell geeignet für das Überleben unter hypoxischen Bedingungen in den Vergleich aufgenommen.

Den Vorteil multipler Hämoglobine für die Höhenatmung der Vögel demonstrieren die vier Hämoglobine des Sperbergeiers; Anpassung an extreme Höhen erfordert hier ein empfindlich reguliertes O_2 -Aufnahme und -transportsystem.

Determinismus durch Funktion entfällt bei Hb D der Andengans. Molekulare Anpassung der Atmung an definierte Höhen (ca. 6000m) ist durch eine Mutation in den β -Ketten gegeben. Die α^D -Ketten entsprechen hier funktionell den α^A -Ketten, wofür die identischen Mutationsraten der beiden α -Ketten der Hämoglobine der Andengans hinweisend sind.

Auffällig ist die ausnahmslose Expression von Hb D bei Vögeln, welche in große bis extreme Höhen vordringen; die Mutationsraten der α^D -Ketten liegen hier in der Größenordnung der α^A -Ketten bei Vergleich zu einer nahe verwandten biologischen Referenz (s. Tab.25).

Vogel	Höhe(m)	biol. Referenz	%Hb D	Austausche α^A/α^D
Streifengans	> 8848	Graugans	10	3/4
Andengans	6000	Graugans	40	9/9
Sperbergeier	11278	Mönchsgeier	16	2/3
Wollkopfgeier	4500	Mönchsgeier	30	1/0
Habicht	4000	Mönchsgeier	15	4/5
Steinadler	7500	Mönchsgeier	35	5/9
Andenkondor	6035	Mönchsgeier	17	10/11

Tab.25: Überblick über das Vorkommen und die Mutationsraten von Hb D im Blut von Vögeln, welche in große Höhen vordringen. Die Austausche sind im Vergleich zu den Hämoglobinen der jeweils angegebenen biologischen Referenz berechnet. Hb des Steinadlers vgl. Lit. 102, des Andenkondors Lit. 103

20. Genetischer Polymorphismus der Globingene der Vögel

Aus genomischen Untersuchungen adulter Hühner^(104,105) und Enten^(106,107) ist bekannt, daß die α -Globinketten von zwei Genorten im Abstand von ca. 2.2 kb codiert werden. Die transkriptionale Anordnung der Gene beträgt: 5'- α^D - α^A -3'

20.1. Expression der vier α -Ketten des adulten Sperbergeiers

Das erstmals beobachtete Vorliegen von vier α -Ketten im Blut des Sperbergeiers legt die Existenz vier distinkter Genorte nahe. Polymorphismus verschiedener Allele erscheint unwahrscheinlich, da die vier Ketten im Blut mehrerer Tiere eindeutig und in gleichen Verhältnissen nachweisbar waren.

Als molekulare Basis wird eine Genduplikation durch ungleiches Cross-over vermutet, wie sie für die α -⁽¹⁰⁸⁾ und γ -⁽¹⁰⁹⁾ Ketten der menschlichen Hämoglobine Hb A und Hb F postuliert wird. In Japan wurde bei einer ethnischen Gruppe sogar eine vierfache Multiplikation des γ -Globingens gefunden⁽¹¹⁰⁾.

Neben der Schaffung neuer Varianten ist ungleiches Cross-over mit dem Phänomen der "konzentrierenden Evolution"⁽¹¹¹⁾ verknüpft, welche für Multigenfamilien charakteristisch ist⁽¹¹²⁾.

Dieser Mechanismus bietet sich als Erklärung für die niedrige Mutationsrate der duplizierten α^A - und α^D -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers an (je ein Austausch pro Paar α^A/α^A und α^D/α^D). Es ist zu postulieren, daß die Genorte, welche für die α^D - und α^A -Ketten codieren, in ihrer Ganzheit dupliziert und durch Genkonversion⁽¹¹³⁾ gegeneinander korrigiert worden sind.

20.2. Polymorphismus der Minorkomponenten der Graugans, Streifengans und Andengans

Vorliegen von zwei Minorkomponenten ist erstmalig im Blut der Graugans, der Streifengans und der Andengans beobachtet worden.

Da nur die DNA-Sequenzen des Huhns und der Ente bekannt sind, müssen Analogieschlüsse gezogen werden.

Zwei Theorien zur Existenz von zwei Minorkomponenten scheinen plausibel:

Es existiert im Genom dieser Vögel ein reaktiviertes oder niedrigexprimiertes zweites α^D -Gen, welches bisher nicht entdeckt wurde.

Ferner könnte das ursprüngliche α^D -Gen Veränderungen in/nach der Expression unterliegen: abgesehen von posttranslationaler Modifikation kann in Analogie zu den Sequenzdaten des α^D -Gens der Ente ein Mechanismus vorgeschlagen werden: hier liegt eine nahezu perfekte Duplizierung der

Exon 1/Intron 1-Spleißsequenz vor⁽⁹³⁾. Es ist zu erwarten, daß nicht nur an der authentischen Spleißstelle, sondern auch innerhalb der duplizierten Spleißsequenz im Intron 1 gespleißt wird⁽¹¹⁴⁾. Das Ergebnis wäre eine um einen Bereich aus Intron 1 verlängerte Globinkette. Die mRNA einer alternativ gespleißten Globinkette konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden⁽¹¹⁴⁾. Im α^D -Gen der Grau- und Streifengans müßte eine alternative Spleißstelle im 2. Intron vorhanden sein, da Intron 1 im Bereich der N-terminal sequenzierten 42 Aminosäurereste der $\alpha^{D'}$ -Ketten liegt.

20.3. Differentielle Expression des α^D -Globingens der Andengans

Das Variieren der Menge an Hb D (4 - 40%) in Blutproben derselben Gans legt die Vermutung nahe, daß die Expression des α^D -Globingens internen bzw. externen Regulationsmechanismen unterliegt. Es ist noch unbekannt, ob die Expression des α^D -Globingens nur auf einen bestimmten Abschnitt der Individualentwicklung (vgl. embryonale/fötale Globingene) beschränkt ist, oder ob dieses Gen durch interne/externe Effektor(en) aktiviert wird.

21. Phylogenetische Betrachtungen

Sequenzvergleich von Globinketten erlaubt die Abschätzung verwandtschaftlicher Beziehungen unter den Spezies. Dabei ist die Zahl der Aminosäuresubstitutionen- nach der maximum parsimony Methode ⁽¹¹⁵⁾ in minimale Nucleotidaustausche umgerechnet- ein Maß für die phylogenetische Distanz. Da die Mutationsrate bei Hämoglobin als einem Protein mit lebensnotwendiger physiologischer Funktion sich aus einem evolutionären und adaptiven Anteil zusammensetzt, liefert ein nach dieser Methode gewonnener Stammbaum besonders für Spezies mit physiologisch vergleichbarer Umgebung definierte Aussagen. Ein derartiger Stammbaum ist für Camivora publiziert worden ⁽¹¹⁶⁾.

Sequenzvergleich der Hämoglobine der Vögel erfordert sorgfältige und kritische Beurteilung, da diese einem starken Selektionsdruck aufgrund der Vielfalt der Lebensräume (hinsichtlich O_2 -Angebot) unterliegen. Dennoch lassen sich Aussagen über Familienzugehörigkeiten treffen.

21.1 Accipitridae (Greife) als genetisch definierte Familie

Tab. 26 gibt einen Überblick über die systematische Stellung der untersuchten Taggreife ⁽¹¹⁷⁾. Vergleich der Hämoglobine zeigt Austausche, welche bei den Hämoglobinen der Vögel nicht beobachtet worden sind (s. Tab. 27). Dies demonstriert, daß diese Greife nahe verwandt sind. Dafür sprechen auch die extrem niedrigen Mutationsraten der β -Ketten (s. Tab. 28).

Ordnung Accipitriformes (Greifvögel)

Unterordnung Accipitres (Greife)

Familie Accipitridae (Greife)

Unterfamilie Aegyptiinae (Altweltgeier)

Genus Trionocephus: *T. occipitalis* (Wollkopfgeier)

Genus Aegyptius: *A. monachus* (Mönchsgeier)

Genus Gyps: *G. rueppellii* (Sperbergeier)

Unterfamilie Accipitrinae (Eigentliche Greife)

Genus Accipiter: *A. gentilis* (Habicht)

Genus Aquila: *A. chrysaetos* (Steinadler)

Position	Hb der Greifvögel	sonstige Hb der Vögel
α^D 18	Gln	Ala/Gly/Thr/Lys/Leu
α^D 23	Asp*	Glu
α^D 73	Met	Leu
α^A 5	Asn	Ala/Thr/Pro/His/Ser
α^A 38	Pro**	Ser/Gln/Thr
α^A 116	Val	Ala/Leu
α^A 134	Asn	Thr/Ala
β 123	Ser	Thr
β 136	Ala	Val

Tab.27: Überblick über die in Hämoglobinen der Greifvögel konservierten Austausche (abweichend von den sonst. Hb der Vögel)

*Ausnahme: α - Ketten der Spaltfußgans⁽¹¹⁸⁾ und des Straußes exprimieren ebenfalls Asp

**Ausnahme: α - Ketten des Huhns⁽⁷⁴⁾ exprimieren ebenfalls Pro

Hämoglobine des Sperbergeiers im Vergleich zu Hämoglobinen von	Austausche		
	β	α^A	α^D
Mönchsgeier	0	2	3
Wollkopfgeler	0	3	3
Habicht	6	2	5
Steinadler	1	4	10
Graugans	9	14	21
Streifengans	8	15	23
Mensch (120)	46	46	56

Tab.28: Austausche in den β - α^A - α^D - Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers im Vergleich zu den angegebenen Spezies.

21.2. Stellung der Andengans in der Familie der Anatidae

Auf der Basis morphologischer Daten wurde ein "Diagramm theoretischer Verwandtschaftsbeziehungen"⁽¹²¹⁾ für die Familie der Anatidae erstellt (s. Abb. 34)

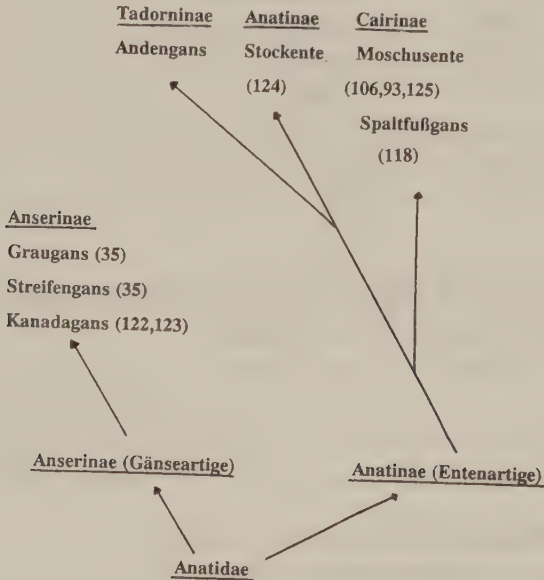


Abb. 34: Überblick über die Familie der Anatidae (Entenartige) und ihre Unterfamilien nach Lit. 121 unter alleiniger Berücksichtigung der Spezies, deren Globinsequenzen bekannt sind. Die Werte in Klammer beziehen sich auf die jeweiligen Literaturstellen.

Tab. 29 zeigt die Austausche der Hämoglobine der Andengans im Vergleich zu den Spezies aus Abb. 34. Es kann bestätigt werden, daß Andengänse näher mit den Anatinae (Entenartige) verwandt sind als mit den Anserinae (Gänseartige).

Hämoglobine der Andengans im Vergleich zu Hämoglobinen von	Austausche		
	β	α^A	α^D
Graugans	7	9	9
Streifengans	6	12	13
Kanadagans	5	9	12
Stockente	5	5	**
Moschusente*	2	5	8
Spaltfußgans	6	19	**

Tab. 29: Austausche in den β -/ α^A -/ α^D -Ketten der Hämoglobine der Andengans im Vergleich zu den angegebenen Spezies

*Aminosäuresequenz von der DNA-Sequenz abgeleitet

** α -Ketten exprimiert; Sequenz unbekannt

22. Identische Hämoglobine

Identischer Minorkomponenten wurden erstmals im Blut des Wollkopfgeiers und Mönchsgeiers beobachtet. Erwähnenswert ist die Expression identischer β -Ketten bei Sperbergeier, Mönchsgeier und Wollkopfgeier. Im einzelnen gibt folgende Tabelle die heute bekannten Beispiele Globinketten identischer Sequenz.

Spezies	identische Ketten
Homo sapiens, Pan paniscus, Pan troglodytes (126)	α, β
Homo sapiens, Pan troglodytes (126,127)	γ
Cebus capucinus (128), Cebus apella (129)	β
Ateles geoffroyi, Ateles fusciceps (130)	δ
Ateles geoffroyi, Ateles belzebuth, Ateles paniscus (131)	β
Saguinus oedipus (132), Saguinus nigricollis (130)	β
Macaca speciosa Cuvier (133), M. fuscata fuscata (134), M. nemestrina (135), M. fascicularis/irus (136)	β
Macaca fuscata fuscata (137), M. mulatta (138)	α
Macaca fuscata fuscata (139), Macaca mulatta (140)	γ
Camelus dromedarius, Camelus ferus bactrianus (141)	α, β
Lama glama, Lama vicugna, Lama pacos (61)	β
Bos primigenius, Bos grunniens (142)	γ
Bos taurus (A-Allele) (143,144), Bos grunniens (145)	β, I
Equus hemionus kulan, Equus zebra (146)	β
Ursus tibetanus, Ursus maritimus, Helarctos malayanus (147)	α, β
Panthera onco, Panthera pardus (148)	α
Panthera onco, Panthera leo (148)	β
Panthera pardus orientalis (149), Panthera onco (148)	α, β
Chironomus thummi thummi (CTT) (150)	I, Ia
Branta canadensis, Cygnus olor (122)	β
Gyps rueppellii, Aegypius monachus (37), Trionoceph occipitalis	β
Aegypius monachus (37), Trionoceph occipitalis	D α

Tab.30: Identische Ketten von Hämoglobinen

E: ZUSAMMENFASSUNG

1. Diese Arbeit erklärt die molekularen Mechanismen der Höhenatmung der Streifengans, der Andengans und des Sperbergeiers; darüberhinaus liefert sie einen wesentlichen Beitrag zum allgemeinen Verständnis der Atmungsphysiologie unter reduzierten Sauerstoffpartialdrücken.
2. Die Primärstrukturen der α^D -Ketten der Hämoglobine der Graugans (*Anser anser*) und der Streifengans (*Anser indicus*), sowie der Hämoglobine der Andengans (*Chloephaga melanoptera*), des Habichts (*Accipiter gentilis*), des Sperbergeiers (*Gyps rueppellii*) und des Wollkopfsgeiers (*Trigonoceps occipitalis*) wurden aufgeklärt (Primärstrukturen von 16 Ketten und N-Terminus von zwei Ketten, = 2360 Sequenzen).
3. Blut der meisten adulten Vögel enthält eine Haupt- (Hb A) und eine Nebenkomponekte (Hb D): es wurde ein empfindliches Verfahren der Trennung dieser Hämoglobine mittels FPLC entwickelt. Dadurch konnten bisher nicht entdeckte Minorkomponenten im Blut der Gänse nachgewiesen werden. Ebenso war es möglich, die nur in einer neutralen Aminosäure pro α -Kette differierenden Hämoglobine des Sperbergeiers in hoher Ausbeute und Reinheit zu trennen.
4. Der molekulare Mechanismus der Höhenatmung der Andengans wurde aufgeklärt, der der Streifengans endgültig bestätigt: bei den Hämoglobinen dieser Spezies ist eine $\alpha\beta_1$ -Bindungsstelle ($\alpha 119$ - $\beta 55$) der Untereinheiten der T-Struktur unterbrochen, so daß das Gleichgewicht zugunsten der höheraffinen R-Struktur verlagert ist. Bei den Hämoglobinen der Streifengans liegt die Mutation in den α^A -Ketten, so daß zwei Hämoglobine unterschiedlicher Affinität die Folge sind.
Bei den Hämoglobinen der Andengans befindet sich der Austausch in den β -Ketten, so daß Hb A und Hb D in ihrer intrinsischen Affinität erhöht sind.
Es wird gefolgert, daß eine affinitätskontrollierte Kaskade der Hämoglobine transitorische Hypoxietoleranz begünstigt, während hohe intrinsische O_2 -Affinität für permanenten Aufenthalt in großen Höhen von adaptivem Vorteil ist.
5. Im Blut des Sperbergeiers, welcher bis in Höhen von 11300m vordringt, konnten vier Hämoglobine, zwei Haupt- (Hb A/Hb A') und zwei Nebenkomponekten (Hb D/Hb D') nachgewiesen werden, ein Polymorphismus, welcher für Vögel erstmals beschrieben ist.. Die paarweise homologen α -Ketten differieren um je einen Austausch.

6. Zur definitiven molekularen Charakterisierung der Höhenatmung des Sperbergeiers mußten in Ergänzung zu den bisher bekannten Hämoglobinen der Taggreife (Andenkondor, Steinadler, Mönchsgeier) elf weitere Primärstrukturen aufgeklärt werden.
- Die ungewöhnliche Hypoxietoleranz des Sperbergeiers findet ihre Erklärung in einer Kaskade der Hämoglobine auf drei Affinitätsniveaus. Moduliert werden diese durch strukturschwächende Mutationen an zwei funktionell wichtigen Bindungsstellen der Untereinheiten ($\alpha_1\beta_1/\alpha_1\beta_2$). Die Substitutionen befinden sich in den α -Ketten ($\alpha 34, \alpha 38$).
7. Blut des Sperbergeiers, Mönchsgeiers und Wollkopfgeiers wurde physiologisch vermessen. Dabei zeigen die Hämoglobine des Wollkopfgeiers hohe intrinsische Gesamtaffinität. Die Hämoglobinkomponenten des Sperbergeiers wurden vermessen und zeigen abgestufte Sauerstoffaffinitäten. Auffällig ist der hohe Phosphateffekt bei Hb A/Hb A'.
- Es wird eine Korrelation zwischen den physiologischen Daten, der Sequenzanalyse und dem Röntgenstrukturmodell gegeben. Bei identischen β -Ketten dieser drei Spezies stellen die α -Ketten die molekularen Modulatoren dar. Die Sequenz $\alpha 34$ bis $\alpha 38$ - fünf Wechselwirkungen der Untereinheiten in Folge- wird bzgl. der Bedeutung für die physiologischen Besonderheiten der Hämoglobine der Greifvögel beurteilt.
- Daneben wird eine partielle bis vollständige Auflösung der C-Helix der $\alpha^A/\alpha^{A'}$ -Ketten der Hämoglobine des Sperbergeiers durch zwei vicinale Prolinreste als Ursache für das erhöhte Ansprechen auf Phosphat erörtert.
8. Die durch Auswertung der Sequenzen gewonnenen Erkenntnisse zur Atmungsphysiologie unter vermindertem Sauerstoffangebot erlauben Vorhersagen bzgl. der Hypoxietoleranz von Vögeln, deren Vordringen in große Höhen bisher noch nicht beschrieben worden ist: hinsichtlich des molekularen Einflusses der Hämoglobine ist der Habicht zur Atmung bis 9000m Höhe befähigt; Basis ist die Ausbildung einer Kaskade mit zwei Affinitätsniveaus aufgrund Mutationen an den gleichen Bindungsstellen, welche für die Höhenatmung des Sperbergeiers determinierend sind.
9. Die Bedeutung von Hb D in evolutionärer und funktioneller Hinsicht wird erörtert. Strukturelle Merkmale sprechen dafür, daß das α^D -Globin ein Intermediat zwischen niedrigexprimiertem Gen und Pseudogen darstellt.
10. Eine mögliche genetische Basis für den Polymorphismus der Globingene der untersuchten Vögel wird angegeben. Für die Entstehung der vier Hämoglobine des Sperbergeiers wird eine Genduplikation als Ursache postuliert.
- Polymorphismus der Minorkomponenten der drei Gänse legt die Existenz eines reaktivierten

oder niedrigexprimierten zweiten α^D -Gens nahe. Es wurde somit in dieser Arbeit das Vorhandensein von fünf Globingenen bei Vögeln entdeckt.

11. Differentielle Expression des α^D -Globingens der Andengans in Blutproben einer Spezies (4 - 40%) läßt auf interne/externe Regulationsmechanismen (Entwicklungszustand oder Effektor) schließen.
12. Charakteristische Austausche und niedrige Mutationsraten der Globinketten belegen, daß die untersuchten Taggreife eine genetisch definierte Familie darstellen.
13. Die Übereinstimmung eines morphologischen Stammbaumes mit den aufgrund der Sequenzdaten ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse der Anatidae wird dargelegt.
14. Es wird eine aktualisierte Tabelle identischer Hämoglobine gegeben. Bei den Hämoglobinen der Vögel wurden erstmals identische Minorkomponenten im Blut des Wollkopfgeiers und Mönchsgeiers nachgewiesen.

F: L I T E R A T U R

- (1) Rahn,H.,(1977) Adaptation of the avian embryo to altitude, in Paintal,A.S., Gill-Kumar,P., (Hrsg.)Respiratory adaptations, capillary exchange and reflex mechanisms, 94-105
- (2) Swan,L.,W.,(1970) Nat.Hist. 79, 68-75
- (3) Black,L.P.,Tenney,S.M.,(1980) Resp.Physiol. 39, 217-239
- (4) Hall,F.G.,Dill,D.B.,Guzman Barron,E.S.,(1936) J. Cell. and Comp. Physiol. 8, 301-313
- (5) Laybourne,R.C.,(1974) Wilson Bull. 86, 461-462
- (6) Scheid,P.,(1979) Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.86,138-186 Resp.Physiol. 21, 393-401
- (7) Antonini,E.,Rossi-Fanelli,A.,Caputo,A.,(1962) Arch.Biochem.Biophys. 97, 343
- (8) Cannan,R.K.,(1971) Science 127,1376-1378
- (9) Rossi-Fanelli,A.,Antonini,E.,(1958) Bioc.Biop.Acta 30, 608-615
- (10)Davis,B.J.,(1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404-427
- (11)Rovera,G.,Magarian,C.,Borun,T.W.,(1978) Anal.Biochem. 85, 506-518
- (12)Brown,J.L.,Ingram,V.M.,(1974) J Biol. Chem. 249, 3960-3972
- (13)Clegg,G.B.,Naughton,M.A.,Weatherall,D.J., (1966) J.Mol.Biol. 19, 91-108
- (14)Hirs,C.H.W.,Moore,S.,Stein,W.H.,(1956) J.Biol.Chem. 219, 623-642
- (15)Guidotti,G.,Hill,R.J.,Konigsberg,W.,(1962) J.Biol.Chem. 237, 2184
- (16)Jauregui-Adell,J.,Marti,J.,(1975) Anal.Biochem. 69, 468-473
- (17)Kratzin,H.,Yang,C.,Krusche,J.U.,Hilschmann,N.,(1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 361, 1591-1598
- (18)Moffat,D.E.,Lyle,R.F.,(1959) Anal.Chem. 31, 926
- (19)Gottlieb,A.J.,Itano,H.A.,(1963) Bioc.Biop.R. 12, 405
- (20)Dagliesh,C.E.,(1952) Biochem.J. 52, 3
- (21)Frank,H.,Petersen,H.,(1955) Z.Physiol.Chem.Hoppe-Seyler 299, 1
- (22)Spackman,D.H.,Stein,W.H.,Moore,S.,(1958) Anal.Chem. 30, 1190-1206
- (23)Matsubara,H.,Sasaki,R.M.,(1969)Biochim.Biophys.Res.Commun. 35, 175-181
- (24)Edman,P.,Begg,G.,(1967) Eur.J.Biochem. 1, 80-91
- (25)Begg,J.,Rücknagel,P.,Zimmermann,J.,Braunitzer,G.,Schuster,W.,(1986) Biol.Chem.Hoppe-Seyler 367, 81-82
- (26)Hunkapillar,M.W.,Hewick,R.M.,Dreyer,W.J.,Hood,L.E.,(1983) Meth.in Enzymol. 91, 399-413
- (27)Braunitzer,G.,Schrack,B.Stangl,A.,Scheithauer,U., (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 359, 137-146
- (28)Braunitzer,G.,Schrack,B.Ruhfus,A.,Petersen,S.,Petersen,U., (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 352, 1730-1732
- (29)Braunitzer,G.,Schrack,B.(1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 351, 417
- (30)Pfletschinger,J.,Braunitzer,G.,(1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 361, 925-931

- (31) Zimmermann, C.L., Pisano, J.J., (1977) *Meth.Enzymol.* 47, 45-51
- (32) Lottspeich, F., (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 361, 1829-1834
- (33) Kleinschmidt, T., unveröffentlichte Ergebnisse
- (34) Dissertation, Hofmann, O., (1986), Universität München Fakultät Chemie und Pharmazie
- (35) Braunitzer, G., Oberthür, W., (1979) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 362, 1101-112
- (36) Oberthür, W., Braunitzer, G., Würdinger, I., (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 363, 581-590
- (37) Hiebl, I., Schneegans, D., Grimm, F., Kösters, J., Braunitzer, G., *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, 368, 11-18
- (38) Perutz, M.F., Kilmartin, J.V., Nishihukura, K., Fogg, J.H., Butler, P.J.G., (1980) *J.Mol.Biol.* 138, 649-670
- (39) O'Donnell, S., Mandaro, R., Schuster, T.M., Arnone, A. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 12204-12208
- (40) Arnone, A., (1972) *Nature* 237, 146-149
- (41) Cashon, R., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Focesi, A., (1986) *J.Biol.Chem.* 261, 12700-12705
- (42) Perutz, M.F., (1983) *Mol.Biol.Evol.* 1, 1-28
- (43) Fermi, G., (1975) *J.Mol.Biol.* 97, 237-256
- (44) Fermi, G., Perutz, M.F., Shaanan, B., (1984) *J.Mol.Biol.* 175, 159-174
- (45) Imai, K., (1985) *Acta Haematol.JPN*, 48, 1993-2001
- (46) Rapoport, S., Guest, G.M., (1941) *J.Biol.Chem.* 138, 269-282
- (47) Johnson, L.F., Tate, M.E., (1969) *Can.J.Chem.* 47, 63-69
- (48) Arnone, A., Perutz, M.F., (1974) *Nature* 249, 34-36
- (49) Keys, A., Hall, F.G., Guzman Barron, E.S., (1936) *Amer.J.Physiol.* 115, 292-294
- (50) Aste-Salazar, H., Hurtado, A., (1944) *Amer.J.Physiol.* 142, 733-745
- (51) Barcroft, J., Binger, C.A., Bock, A.V., Daggart, J.H., Forbes, H.S., Harrop, G., Meakins, J.C., Redfield, A.C., (1922) *Philos.Trans.R.Soc. London, Ser. B.* 211, 351-389
- (52) Hurtado, A., (1964) *Handbook of Physiology, Adaptation to the Environment*, Washington DC.; *Am. Physiol.Soc.*, sect.4, Kap. 54, 843-860
- (53) Morpurgo, G., Battaglia, P., Bernini, L., Paolucci, A.M., Modiano, G., (1970) *Nature* 227, 387-388
- (54) Morpurgo, G., Arese, P., Bosia, A., Pescarmona, G.P., (1976) *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 73, 747-751
- (55) Turek, Z., Kreuzer, F., Hoofd, L.J.C., (1973) *Pflügers Arch.* 342, 185-197
- (56) Turek, Z., Kreuzer, F., Ringnald, B.E.M., (1978) *Pflügers Arch.* 376, 7-13
- (57) Eaton, J.W., Skelton, T.D., Berger, E., (1974) *Science* 183, 743-744
- (58) Hebbel, R.P., Eaton, J.W., Kronenberg, R.S., Zanjani, E.D., Moore, L.G., Berger, E.M., (1978) *J.Clin.Invest.* 62, 593-600
- (59) Torrance, J.D., Lenfant, L., Cruz, J., Marticorena, E., (1970/71) *Respir.Physiol.* 11, 1-15
- (60) Weiskopf, R.B., Severinghaus, J.W., (1972) *J.Appl.Physiol.* 33, 276-277
- (61) Kleinschmidt, T., März, J., Jürgens, K.D., Braunitzer, G. (1986) *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, 367, 153-160

- (62) Braunitzer, G., Jelkmann, W., Stangl, A., Schrank, B., Krombach, C., (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 683-691
- (63) Braunitzer, G., Stangl, A., Schrank, B., Krombach, C., Wiesner, H., (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 743-749
- (64) Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A., Bauer, C. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 921-925
- (65) Braunitzer, G., Stangl, A., Schrank, B., Bauer, C. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 547-558
- (66) Kleinschmidt, T., de Joung, W. W., Braunitzer, G., (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 239-245
- (67) Braunitzer, G., (1980) Klin. Wschr. 58, 701-708
- (68) Würdinger, I., (1973) International Zoo. Yearbook 13, 43-47, London, The Zoological Society
- (69) Petschow, D., Würdinger, I., Baumann, R., Duhm, J., Braunitzer, G., Bauer, C., (1977) J. Appl. Physiol. 42, 139-143
- (70) Chemical Zoology (1978), Hrsg. M. Florkin, B. T. Scheer, Bd. X, Aves, S. 253ff, Academic Press New York, San Francisco, London
- (71) Salathe, E. P., Kolkka, R. W., (1986) Biophys. J. 50, 885-894
- (72) Brown, L., (1979) Die Greifvögel, Parey Verlag, Hamburg
- (73) Weber, R. E., Lykkeboe, G., (1978) J. Comp. Physiol. B. 128, 127-137
- (74) Knöchel, W., Wittig, B., Wittig, S., John, M. E., Grundmann, U., Oberthür, W., Godovac, J., Braunitzer, G., (1982) Nature 295, 710-712
- (75) Vandecasserie, C., Paul, C., Schnek, A. G., Leonis, J., (1973) Comp. Biochem. Physiol. 44A, 711-718
- (76) De Bruin, S. H., Janssen, L. H. M., Van Os, G. A. J., (1973) Bioc. Biop. Res. Comm. 55, 193-199
- (77) De Bruin, S. H., Rollema, H. S., Janssen, L. H. M., Van Os, G. A. J., (1974) Bioc. Biop. Res. Comm. 58, 204-209
- (78) Borgese, T. A., Bertles, J. F., (1965) Science N. Y. 148, 509-511
- (79) Rücknagel, P., Reischl, E., Braunitzer, G., (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 163-1171
- (80) Paul, C., Vandecasserie, C., Fraboni, A., Depreter, J., Leonis, J., Schneck, A. G., (1978) in Interaction Moleculaires de l'Hemoglobine, Colloque l'INSERM Paris (Labie, D., Poyart, F. U., Rosa, J., Hrsg.) 183-200, Editions INSERM, Paris
- (81) Godovac-Zimmermann, J., Braunitzer, G., (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1107-1113
- (82) Godovac-Zimmermann, J., Braunitzer, G., (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 503-508
- (83) Chapman, B., Tobin, A., Hood, L., (1981) J. Biol. Chem. 255, 9051-9059
- (84) Ciotto, C., Geraci, G., (1975) Comp. Biochem. Physiol. A. 51, 159-163
- (85) Czelusniak, J. O., Goodman, M., Hewett-Emmett, D., Weiss, M. L., Venta, P. J., Tashian, R. E., (1982) Nature 298, 297-300
- (86) Godovac-Zimmermann, J., Braunitzer, G., (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1107-1115

- (87) Baumann,R.,Goldbach,E.,Haller,E.A.,Wright,P.G.,(1984) *Biochem.J.* 217, 767-771
- (88) Baumann,R.,Gros,C., (1983) in Brüssel's Hemoglobin Symposium,(Hrsg. Schnek,P.) Faculte des Sciences, Editions de l'Universite de Bruxelles, 151-160
- (89) Oberthür,W.,Godovac-Zimmermann,J.,Braunitzer,G., (1983) in Brüssel's Hemoglobin Symposium, (Hrsg. Schnek,P.) Faculte des Sciences, Editions de l'Universite de Bruxelles
- (90) Tahar,S.B.,Scherrer,K.,(1983) *Mol.Biol.Rep.* 9, 101-113
- (91) Roninson,J.B.,Ingram,V.M.,(1982) *Cell* 28, 515-521
- (92) Proudfoot,N.J.,Maniatis,T.,(1980) *Cell* 21, 537-544
- (93) Erbil,C.,Niessing,J.,(1983) *EMBO J.* 2, 1339-1343
- (94) Breathnach,R.,Chambon,P.,(1982) *Annu.Rev.Biochem.* 50, 349-383
- (95) Lerner,M.R.,Boyle,J.A.,Mount,S.M.,Wolin,S.L.,Steitz,J.A.,(1980) *Nature* 283, 220-224
- (96) Orkin,S.H.,Kazazian,Jr.,H.H.,Antonarakis,S.E.,Goff,S.C.,Sexton,J.P.,Waber,P.G., Giardina,P.J.V.,(1982) *Nature* 296, 627-631
- (97) Treisman,R.,Proudfoot,N.J.,Shander,M.,Maniatis,T.,(1982) *Cell* 29, 903-911
- (98) Little,P.F.R.(1982) *Cell* 28, 683-684
- (99) Niessing,J.,Erbil,C.,Neubauer,V.,(1982) *Gene* 18, 187-191
- (100) Martin,S.L.,Zimmer,E.A.,Kan,Y.W.,Wilson,A.C.,(1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 77, 3563-3566
- (101) Naeije,R.,Melot,C.,Lejeune,P.,(1986) *Am. Rev. Respir.Dis.* 134, 332-333
- (102) Oberthür,W.,Braunitzer,G.,Grimm,F.,Kösters,J.,(1983) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 364, 851-858
- (103) Bauer,H.,Braunitzer,G.,Oberthür,W.,Kösters,J.,Grimm,F.,(1985) *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 366, 1141-1148
- (104) Engel,J.D.,Dodgson,J.B.,(1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 2596-2600
- (105) Dodgson,J.B.,McCune,K.C.,Rusling,D.J.,Krust,A.,Engel,J.D.,(1981) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, 5998-6002
- (106) Erbil,C.,Niessing,J.,(1982) *Gene* 20, 211-217
- (107) Erbil,C.,Niessing,J.,(1984) *Gene* 32, 161-170
- (108) Lauer,J.,Shen,C.D.,Maniatis,T.,(1980) *Cell* 20, 119-130
- (109) Shen,S.H.,Slightom,J.C.,Smithies,O.,(1981) *Cell* 26, 192-203
- (110) Shimasaki,S.,Juchi,J.,(1986) *Blood* 67, 784-788
- (111) Dower,G.,(1986) *TIG* 2, 159-165
- (112) Hood,L.,Campbell,J.H.,Elgin,S.C.R. (1975) *Ann.Rev.Genet.* 9, 305-359
- (113) Kourilsky,P., (1986) *TIG* 2, 60-63
- (114) Niessing,J.,pers. Mitteilung
- (115) Moore,G.W.,Barnabas,J.,Goodman,M.,(1973) *J.Theor. Biol.* 38, 459-485
- (116) Tagle,D.A.,Miyamoto,M.M.,Goodman,M.,Hofmann,O.,Braunitzer,G.,Gölthenboth,R.,Jalanka,H., (1986) *Naturwissenschaften* 73, 511-514

- (117)Wolters,H.,(1975-82) Die Vogelarten der Erde, Paul Parey, Hamburg
- (118)Oberthür,W.,Wiesner,H.,Braunitzer,G.,(1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 364, 51-59
- (119)Oberthür,W.,Godovac-Zimmermann,J.,Braunitzer,G.,(1986)367, 507-514
- (120)Braunitzer,G.,Gehring-Müller,R.,Hilschmann,N.,Hilse,K.,Hobom,G.,Rudloff,V.,
Wittmann-Liebold,B.,(1961) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 325, 283-286
- (121)Delacour,J.,Mayr,E.,(1945) The Wilson Bulletin 57, 2-55
- (122)Oberthür,W.,Godovac-Zimmermann,J.,Braunitzer,G.,(1982)Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 777-787
- (123)Hiebl,I.,Schneegans,D.,Braunitzer,G.,(1986) Biol.Chem.Hoppe-Seyler 367, 591-599
- (124)Godovac-Zimmermann,J.,Braunitzer,G.,(1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 364, 665-673
- (125)Niessing,J.,(1981) Biochem. Int. 2, 113-120
- (126)Goodman,M.,Braunitzer,G.,Stangl,A.,Schrack,B., (1983) Nature 303, 546-548
- (127)de Jong,W.W.W.,(1971) Biochim. Biophys.Acta 251 217-226
- (128)Tanioka,Y.,Araya,A.,Maita,T.,Matsuda,G.,(1986) Biol.Chem.Hoppe-Seyler 367, 147-152
- (129)Watanabe,B.,Seikagaku,(1974) J.Jap. Chem. Soc. 46, 255-267
- (130)Boyer,S.H.,Crosby,E.F.,Noyes,A.N.,Fuller,G.F.,Leslie,S.E.,Donaldson,L.J.,Vrablik,G.R.,
Schäfer,E.W.,Jr.Thurmon,T.F.,(1971) Biochem.Genet. 5, 405-448
- (131)Boyer,S.H.,Crosby,E.F.,Fuller,G.F.,Noyes,A.N.,Adams,J.G., (1969) Ann. N.Y.
Acad. Sci. 165, 360-377
- (132)Maita,T.,Hayashisa,M.,Matsuda,G.,(1974) J. Biochem. 95, 805-813
- (133)Maita,T.,Tanioka,Y.,Nakayama,S.,Matsuda,G.,(1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 1149-1154
- (134)Matsuda,G.,Maita,T.,Ota,H.,Tachikawa,I.,Tanaka,Y.,Araya,A.,Nakashima,Y.,
(1971) Int. J. Protein Res. 3, 53-55
- (135)Nute,P.E.,Pataryas,H.A.,(1974) Am. J. Phys. Anthropol. 40, 75-82
- (136)Wade,P.T.,Barnikot,N.A.,Huehns,R.E.,(1970) Biochim.Biophys.Acta 221, 450-466
- (137)Matsuda,G.,Maita,T.,Ota,H.,Araya,A.,Nakashima,Y.,Ishii,U.,Nakashima,Y.,
(1973) Int. J. Protein Res. 5, 405-418
- (138)Matsuda,G.,Maita,T.,Ota,H.,Takei,H.,(1970) Int. J. Protein Res. 2, 99-108
- (139)Takenaka,A.,Takenaka,O.,Ohuchi,M.,Nakamura,S.,Takakashi,K.,(1986)
Hemoglobin 10, 1-13
- (140)Mahoney,W.C.,Nute,P.E.,(1980) Biochemistry 19, 4436-4442
- (141)Braunitzer,G.,Schrack,A.,Stangl,A.,Wiesner,H.,(1980)J.Chem.Soc.Pak. 2, 1-7
- (142)Lalthantluanga,R.,unveröffentlichte Ergebnisse
- (143)Schroeder,W.A.,Shelton,J.R.,Shelton,J.B.,Robberson,B.,Babin,D.R.,(1967)
Arch.Biochem.Biophys. 120, 124-135

- (144) Schimenti, J.C., Duncan, C.H., (1984) Nucl. Acid. R. 12, 1641-1655
- (145) Lalthantluanga, R., Wiesner, H., Braunitzer, G., (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 63-68
- (146) Mazur, G., Braunitzer, G., (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 59-71
- (147) Hofmann, O., Schreitmüller, T., Braunitzer, G., Wiesner, H., (1986) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 53-59
- (148) Ahmed, A., Jahan, M., unveröffentlichte Ergebnisse
- (149) Abbasi, A., Braunitzer, G., (1985) J. Prot. Chem. 4, 57-67
- (150) Goodman, M., Braunitzer, G., Kleinschmidt, T., Aschauer, H., (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 205-217

L E B E N S L A U F

04.04.1961

*Geboren in Starnberg als Tochter des lt. Baudirektors Kastulus Hiebl und dessen Ehefrau
Dipl.Chem. Irma Hiebl, geb. Becker*

1967 - 1971

Besuch der Grundschule an der Walliser Straße in München

1971-1980

Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums Fürstenried-West in München

Juni 1980

Abschluß des Gymnasiums mit der Abiturprüfung

Aufnahme in die Bayrische Begabtenförderung

November 1980 - Dezember 1984

Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Oktober 1982

Ablegen der Lebensmittelchemischen Vorprüfung

April 1983

Aufnahme in die Bischöfliche Studienförderung Cusanuswerk

Dezember 1984

Abschluß des Studiums mit der 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Seit Januar 1985

*Promotion in der Proteinchemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei
Prof. Braunitzer*

